

Aus dem Institut für Anthropologie und
Humangenetik der Universität Freiburg i.Br.

Direktor: Professor Dr. Dr. H. Baitsch

Biochemische und Genetische Untersuchungen
zur Wirkung der α -Keto-Isocaproinsäure-Oxydase

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde

einer

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i. Br.

vorgelegt von

Michael Hüfner

geboren in

Dessau

1966

Aus dem Institut für Anthropologie und
Humangenetik der Universität Freiburg i.Br.

Direktor: Professor Dr. Dr. H. Baitsch

Biochemische und Genetische Untersuchungen
zur Wirkung der α -Keto-Isocaproinsäure-Oxydase

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
einer

Hohen Medizinischen Fakultät
der

Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i. Br.

vorgelegt von

Michael Hüfner

geboren in

Dessau

1966

Referent: Priv.Do. Dr. H.W. Goedde

Dekan: Prof. Dr. H.U. Zollinger



Folgende Abkürzungen werden verwandt:

Kik = α -Keto-isocaprinsäure
Kiva = α -Keto-isovaleriansäure
Meva = α -Keto- β -methylvaleriansäure
TPP = Thiaminpyrophosphat
CoA = Coenzym A
NAD = Nicotinamid-adenin Dinucleotid
FAD = Flavin-adenin Dinucleotid
FMN = Flavin Mononucleotid
DEAE = Diaethylaminoethyl
DCP = Dichlorphenol-indophenol
LDH = Lactatdehydrogenase
Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Präparate und Methoden	6
Ergebnisse	
1) Verteilung der α -Keto-isocapronsäure-Oxydase in Lebern verschiedener Tier- spezies u. verschiedenen Organen d. Rindes.	11
2) Anreicherung der α -Keto-isocapronsäure- Oxydase aus Rinderleber.	12
3) Säulenchromatographie angereicherter α -Keto-isocapronsäure-Oxydase.	14
4) pH- u. Pufferabhängigkeit von α -Keto- isocapronsäure-Oxydase.	17
5) Aktivität von α -Keto-isocapronsäure- Oxydase in Abhängigkeit von der Zeit.	18
6) Bestimmung des Reaktionsgleichgewichtes im Standarttest für α -Keto-isocapron- säure-Oxydase.	19
7) Bestimmung der Michaelis-Konstante von α -Keto-isocapronsäure-Oxydase.	20
8) Inhibitorkonstanten für verschiedene In- hibitoren d. α -Keto-isocapronsäure-Oxydase.	21
9) Substratspezifität angereicherter α -Keto- isocapronsäure-Oxydase.	24
10) pH-Optimum von α -Keto- β -methylvalerian- säure-Oxydase.	25
11) Versuche zur Herstellung eines Apoen- zyms d. α -Keto-isocapronsäure-Oxydase.	26
12) Einfluss von Cofaktoren u. Arsenit auf die Aktivität d. α -Keto-isocapronsäure- Oxydase.	27
Familienuntersuchungen zur Ahornsirup- krankheit.	28
Discussion	30
Zusammenfassung	37
Literatur	38

Einleitung.

Als essentielle Aminosäuren bezeichnet man diejenigen, die von einem bestimmten Organismus nicht selbst synthetisiert werden können, sondern mit der Nahrung zugeführt werden müssen. Für den Menschen kennen wir acht essentielle Aminosäuren; unter diesen auch die mit einer verzweigten Kohlenstoffkette: Valin, Leucin und Isoleucin.

Die Synthese dieser Aminosäuren findet in Bakterien und Pflanzen statt. Es entstehen dabei zuerst die den Aminosäuren entsprechenden α -Ketosäuren und zwar im Falle des Valins durch Kondensation von Acetyl-Coenzym A und Pyruvat mit nachfolgender Methylgruppenverschiebung die α -Keto-isovaleriansäure (62, 63)

Die dem Isoleucin entsprechende α -Keto- β -methylvaleriansäure wird wahrscheinlich in analoger Weise gebildet, wobei nicht Pyruvat sondern α -Ketobuttersäure Kondensationspartner ist. Die Leucinvorstufe α -Keto-isocaproinsäure könnte durch Kondensation von Acetyl-Coenzym A und α -Keto-isovaleriansäure (α -isopropyl- α -hydroxy-succinat) mit nachfolgender Decarboxylierung entstehen. Viele Einzelheiten über die Bildung der verzweigten Kohlenstoffketten sind aber auch heute noch unklar. Die ersten Schritte des Abbaus der verzweigt-kettigen Aminosäuren im Säugetier erfolgen in weitgehender Analogie zum Fettsäureabbau entsprechend der "Fettsäurespirale" (18, 39). Bei der Stufe der Verzweigung kommt es jedoch zu einigen Besonderheiten.

Der Abbau des Valins führt über Methyl-malonyl-Coenzym A und Carboxylgruppenverschiebung unter Beteiligung von Coenzym-B₁₂ zum Succinat und mündet damit direkt in den Zitronensäure-Zyklus. Ein Nebenweg verläuft eventuell vom Methyl-malonsäuresemialdehyd zur β -Aminoisobuttersäure, die dann im Urin ausgeschieden wird. -

Isoleucin wird analog der Fettsäureoxydation zu Acetyl-Coenzym A und Propionyl-Coenzym A abgebaut. Letzteres wird wiederum durch Carboxylierung und Carboxylgruppenverschiebung in Succinyl-Coenzym A übergeführt.

Die wichtigsten Stufen des Leucinabbaus sind in Abbildung 1 wiedergegeben.

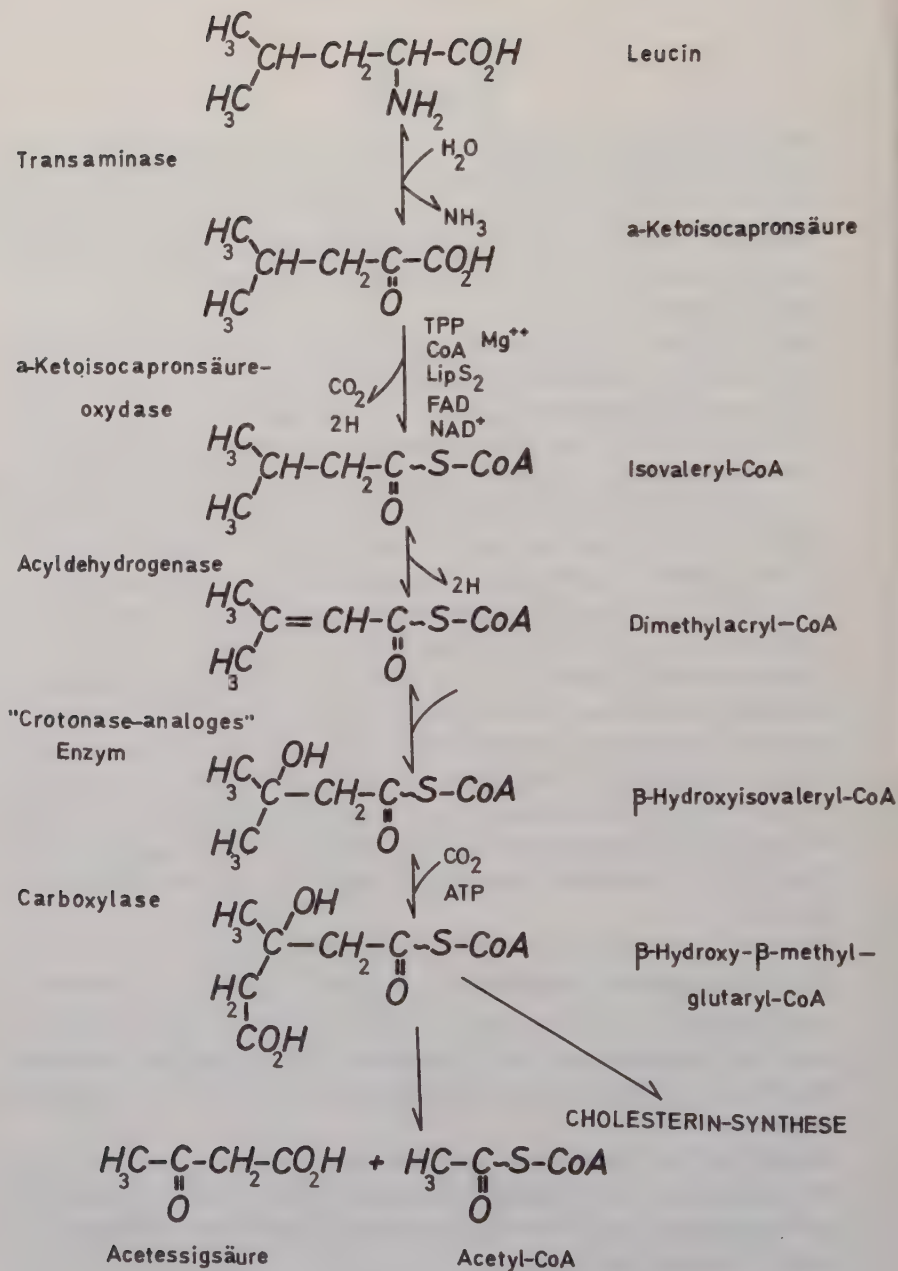


Abb.1 Abbau des Leucins im Säugetierorganismus.

Die Zwischenstufen des Abbaus der verzweigtkettigen Aminosäuren sind weitgehend gesichert. Vor allem Untersuchungen mit radioaktiv markierten Aminosäuren brachten hier wertvolle Aufschlüsse (2,3,5,44). Die Hinweise in der Literatur über die beteiligten Enzyme und deren genauere Eigenschaften sind dagegen spärlich. Man stützt sich meist auf Analogieschlüsse zum gut untersuchten Fettsäureabbau bzw. zu Enzymen, die bei ähnlich ablaufenden Reaktionen beteiligt sind (44). Obwohl dies teilweise berechtigt erscheint, ist die Struktur der verzweigtkettigen Aminosäuren doch so verschieden von anderen Aminosäuren bzw. unverzweigten Fettsäuren und Dicarbonsäuren, dass eine Untersuchung bekannter Reaktionen an diesem Spezialfall unter Umständen weitere Klarheit, zumindest aber eine Bestätigung grundsätzlich bekannter Abbauewege erbringen sollte.

Diese Arbeit beschäftigt sich vornehmlich mit dem Abbau des Leucins bzw. mit der oxydativen Decarboxylierung der α -Ketoisocaproensäure, die durch Trans - oder Desaminierung von Leucin entsteht.

Der Mechanismus der oxydativen Decarboxylierung von α -Ketosäuren ist relativ kompliziert und wird in seinen Einzelheiten erst seit kurzem verstanden, nachdem genügend reine Enzympräparate zur Verfügung standen. Heute hat man sehr detaillierte, experimentell gesicherte Vorstellungen über Funktionen und Eigenschaften dieser Enzyme.

Das am häufigsten untersuchte Enzym dieser Gruppe ist die Pyruvat-Oxydase, die zunächst aus Bakterien, vor allem E. Coli (33,34,49), isoliert wurde, aber auch aus Hefe (1,25), aus Schweineherz (32,36,50) und Taubenbrustmuskel (30,51,56,57). Nicht weniger Interesse vor allem in jüngerer Zeit hat auch die α -Ketoglutarat-Oxydase auf sich gezogen, zu deren weitgehenden Anreicherung das gleiche Ausgangsmaterial benutzt wurde wie zur Gewinnung der Pyruvat-Oxydase, also E. Coli (33,35,48,49), Taubenbrustmuskel (51) und Schweineherz (32,40,49,50,52,53,54,59).

Die α -Ketosäure-Oxydasen sind Multienzymkomplexe, die zu ihrer Funktion verschiedene Cofaktoren benötigen. Es handelt sich dabei um Thiaminpyrophosphat (TPP), Liponsäure, Coenzym A (CoA), Flavinadenin-dinucleotid (FAD), Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD)

und Magnesium-Ionen⁽¹⁹⁾).

Zunächst gelang es, die Pyruvat-Oxydase aus E.Coli durch einfache Ammoniumsulfat-Fraktionierung in zwei Komponenten aufzutrennen, von denen eine die Decarboxylierung katalysierte, während die andere Lipoamid-oxidoreduktase - Aktivität zeigte. Nur beide Fraktionen zusammen katalysierten die Gesamtreaktion wie das unbehandelte Enzym. Schliesslich wurde noch eine Thiol-transacetylase^(20,21) ebenfalls in E.Coli entdeckt (heute bezeichnet man dieses Enzym als Liponsäure-reduktase-transacetylase). Der Pyruvat-Oxydase Komplex aus E.Coli besteht also aus drei Enzymen: der Decarboxylase, der Reduktase-transacetylase und der Lipoamid-oxidoreduktase. Auf Grund neuerer elektronenmikroskopischer Untersuchungen⁽¹²⁾ wird vermutet, dass eine Einheit des Pyruvat-Oxydase Komplexes aus E.Coli durch 16 Moleküle Decarboxylase, 64 Moleküle Reduktase-transacetylase und 8 Moleküle Lipoamid-oxidoreduktase gebildet wird. Der gesamte Komplex hat ein Molekulargewicht von etwa $4,8 \times 10^6$.

Ähnliche Experimente wurden auch an der α -Ketoglutarat-Oxydase aus Schweineherz durchgeführt. Massey⁽⁴⁰⁾ gelang eine Spaltung dieses Enzyms in zwei Fraktionen durch Behandlung mit Harnstoff und Trennung auf einer Säule aus Ca-Phosphatgel. Er fand eine farblose Fraktion, die Thiaminpyrophosphat und Liponsäure enthielt. Diese Fraktion katalysierte die oxydative Decarboxylierung von α -Ketoglutarat unter Verwendung von Ferricyanid als Elektronenacceptor - nicht dagegen die Oxydation mit NAD. Die zweite Fraktion war gelb und erwies sich als Lipoamid-oxidoreduktase. Sie enthält FAD als Coenzym, wodurch die erwähnte Gelbfärbung zustande kommt.

Searls u. Sanadi⁽⁶⁰⁾ kamen zu einem ähnlichen Ergebnis durch Behandlung der α -Ketoglutarat-Oxydase mit Trypsin und nachfolgender fraktionierter Fällung mit Ammoniumsulfat.

In einer Vielzahl von Einzeluntersuchungen, vor allem an der Pyruvat-Oxydase, wurden die verschiedenen Reaktionsstufen auf dem Weg zum Acetyl-Coenzym A aufgeklärt. So konnten die sehr labilen Zwischenstufen des Pyruvat-Abbaus am TPP nachgewiesen werden. - Es handelt sich dabei um das am TPP gebundene Pyruvat, das sogenannte "aktive Pyruvat" ⁽²⁶⁾ und - nach der Decarb-

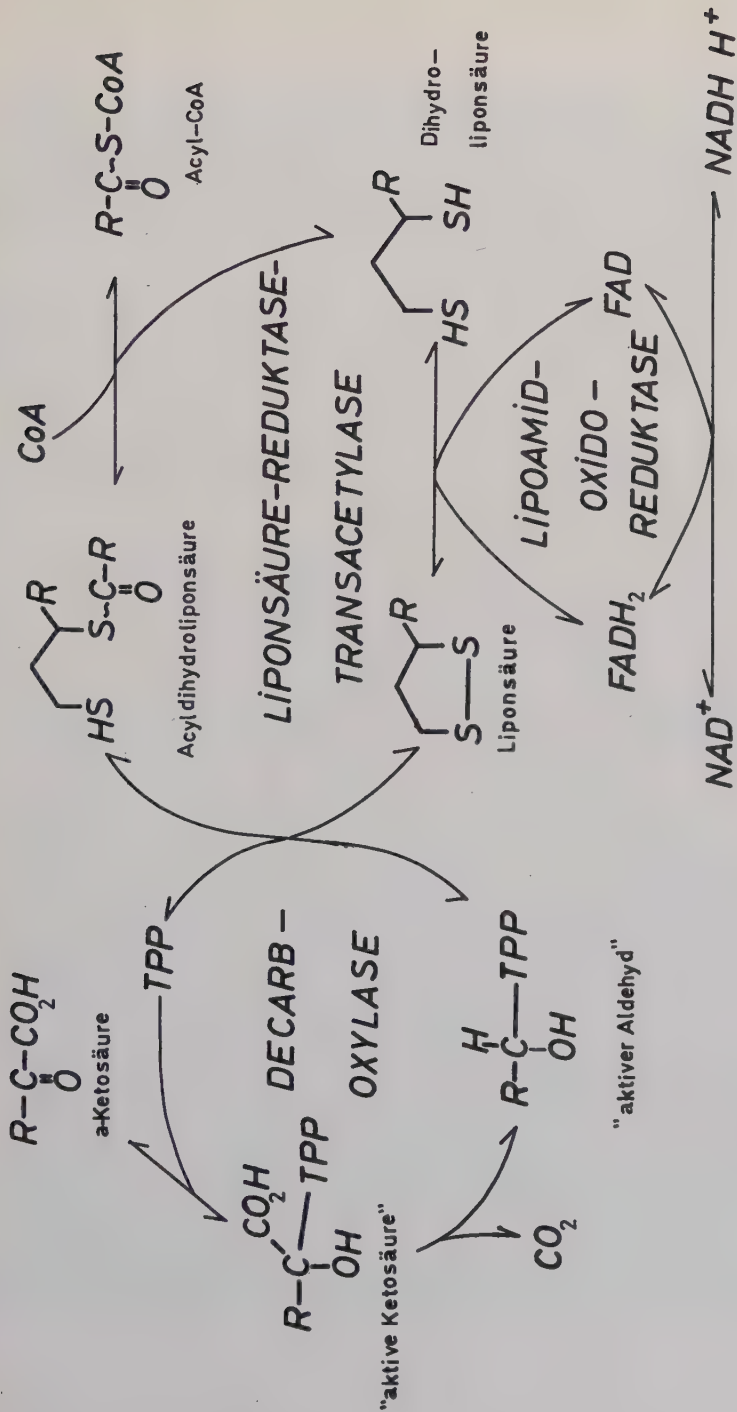


Abb.2 Reaktionen am Enzymkomplex der α-Ketosäure-Oxydasen.

oxylierung - um den an das TPP gebundenen Acetaldehyd, den sogenannten "aktiven Aldehyd" (2- (a-Hydroxyäthyl)Thiamin-pyrophosphat = HETPP) (15,27). Ausserdem wird noch eine an das TPP gebundene Essigsäure postuliert, die aber noch nicht nachgewiesen werden konnte.

Der Acyl-Rest wird anschliessend an Liponsäure in Form eines energiereichen Thioesters gebunden, wobei gleichzeitig eine Reduktion der Liponsäure eintritt (22). Während dieses Schrittes findet also die eigentliche Oxydation des Substrates statt. Danach erfolgt die Übertragung des Acyl-Restes auf Coenzym A. Der Energieinhalt der Verbindung bleibt dabei erhalten. Die eben genannten Schritte werden durch das Enzym Liponsäure-Reduktase-transacetylase katalysiert (20).

Die Acyl-CoA-Verbindung ist wahrscheinlich das physiologische Endprodukt der oxydativen Decarboxylierung. Sie ist auf Grund ihrer energiereichen Thioesterbindung zu weiteren Reaktionen im Intermediärstoffwechsel in der Lage.

Das dritte bekannte Enzym des Proteinkomplexes, die Lipoamid-oxidoreduktase (Liponsäure-dehydrogenase, Diaphorase), katalysiert die Reoxydation der Dihydroliponsäure zur Liponsäure. Sie wurde von Straub (64) und Savage (55) aus Schweineherz isoliert. Aus Grund seines FAD Gehaltes hat das Enzym eine gelbe Farbe, die durch Zugabe von NADH verschwindet und nach Zusatz von Liponsäure wieder erscheint. Aus diesem Verhalten schloss man, dass der Transport des Wasserstoffs von der Dihydroliponsäure auf FAD und von dort auf NAD stattfindet. Zahlreiche Untersuchungen, vor allem von Sanadi et al. (52,61) und Massey et al. (41,42,43) mittels spektroskopischer Methoden und verschiedener Arten der Arsenit-Hemmung, zeigten weiterhin, dass der Elektronentransport von der Dihydroliponsäure über eine proteineigene Dithiol-Gruppierung auf das FAD erfolgt.

In Abbildung 2 ist zusammenfassend dargestellt, wie man sich heute den Ablauf der oxydativen Decarboxylierung vorstellt.

Von besonderem Interesse bei den hier durchgeführten Untersuchungen war die Frage nach der Spezifität der Oxydasen der verzweigtkettigen α -Ketosäuren, d.h. ob für jede der drei Keto-

säuren ein spezifisches Enzym vorhanden ist ,oder ob alle drei Ketosäuren mit einer relativ unspezifischen Oxydase reagieren. Diese Fragestellung war einerseits von allgemein biochemischen Interesse: In welchem Masse nämlich verlaufen die Stoffwechselwege der genannten Aminosäuren auch schon in den Anfangsschritten getrennt? Hierdurch würden wichtige Hinweise über die Regulation dieses speziellen Stoffwechselweges gegeben. Andererseits waren diese Untersuchungen von Bedeutung für das bessere Verständnis einer genetisch bedingten Stoffwechselkrankheit, die als Ahornsirupkrankheit bekannt ist.

Die Ahornsirupkrankheit zählt zu der Gruppe der "Inborn Errors of Metabolism". Homozygote für das mutierte, atypische Allel des Gens, das normalerweise die Synthese des Ketosäureoxydase - Proteins steuert, verhalten sich während der ersten fünf Lebenstage unauffällig. Dann kommt es zunehmend zu Nahrungsverweigerung, Erbrechen und Hypotonie der Muskulatur. Im weiteren Verlauf entsteht eine Decerebrationsrigidität mit Krämpfen und in tiefer Bewusstlosigkeit kommt es innerhalb weniger Tage bis Wochen zum Exitus letalis. Charakteristisch für die fortgeschrittenen Stadien dieser Krankheit ist ein eigentümlicher, obstartiger Geruch des Urins, der Ähnlichkeit mit Ahornsirup haben soll (8, 24, 47, 67).

Nach den heute vorliegenden Ergebnissen besteht kein Zweifel mehr, dass bei dieser Erkrankung der Abbau der verzweigtkettigen Aminosäuren gestört ist und zwar auf der Stufe der oxydativen Decarboxylierung der entsprechenden α -Ketosäuren. Infolgedessen zeigt sich ein Anstau der verzweigten Aminosäuren und α -Ketosäuren im Blut. Ebenso ist die Ausscheidung dieser Substanzen im Urin stark erhöht (6, 46). Es liess sich nachweisen, dass in Leukozyten von Individuen, die heterozygot waren für das oben bezeichnete, mutierte Allel, die Aktivität der α -Keto-isocaproinsäure-Oxydase signifikant erniedrigt war (7, 16, 17, 38). Auf der Messung dieser Enzymaktivität beruht der Heterozygoten-Test, mit dem zwei Familien, in denen Krankheitsfälle diagnostiziert worden waren, untersucht wurden.

Über die Ergebnisse dieser Untersuchungen wird im zweiten Teil der Dissertation berichtet.

Präparate und Methoden.

- A) a-Keto-isocaprinsäure 1 ^{14}C , a-Keto- β -methylvaleriansäure 1 ^{14}C und L-Aminosäure-Oxydase (*Crotaleus adamanteus*) bezogen wir von der Firma Calbiochem (Los Angeles, USA). Unmarkierte a-Keto-isocaprinsäure und Isovaleriansäure (isomerenfrei) erhielten wir von der Fluka AG. a-Keto-isovaleriansäure und Ca-Phosphatgel wurden von der Firma Sigma (St. Louis, USA) geliefert. L-Isoleucin (allofrei) bezogen wir von der Firma Serva (Heidelberg). Katalase (Kristallsuspension) und Coenzym A wurden von der Firma Boehringer & Soehne GmbH geliefert, ebenso NAD. Thiaminpyrophosphat (Tetrahydrat) erhielten wir von der Firma E. Merck. DEAE-Zellulose und P-Zellulose bezogen wir bei der Firma Schleicher & Schüll.

B) Herstellung von a-Keto- β -methylvaleriansäure nach der Vorschrift von Meister (45):

Inkubationsansatz:

Na-Phosphatpuffer M/10, pH 8,0	50 ml
L-Isoleucin M/10	20 ml
L-Aminosäure-Oxydase	30 ml = 100 mg
Katalase (Kristallsuspension)	0,3 ml

Gesamtvolumen = 100 ml

Temperatur = 37 °C

Es wurde 4 Stunden unter ständiger O_2 -Begasung in der Warburg-Apparatur inkubiert. Nach 0,5 h, 1 h, 2 h, und 3 h wurde der pH-Wert mit 0,1 N NaOH nachgestellt.

Nach der Inkubation wurde die Lösung mit 1 N HCl auf pH 4,5 eingestellt, dann mit 2 g Aktivkohle 30 Minuten auf 65 °C erhitzt und anschliessend filtriert. Durch Lyophilisieren wurde die Lösung auf etwa 40 ml eingeengt und danach 6 mal mit dem gleichen Volumen Äther extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden über Nacht (in einer flachen Schale) über P_2O_5 im Exsiccator getrocknet und dann im Rotationsverdampfer eingeengt. Es blieb eine intensiv nach Obst riechende, gelbliche Flüssigkeit zurück. Diese wurde mit Äther möglichst quantitativ

in einen Destillationskolben übergeführt.

Die Destillation wurde bei 10 - 12 mm Hg vorgenommen (Wasserstrahlpumpe). Der Destillationskolben wurde durch ein Wasserbad auf 72° - 75°C gebracht. Der Kondensor (Überleitungsstück) wurde auf 60° - 65°C erwärmt, um eine Kondensation der Ketosäure an diesem Teil der Apparatur zu verhindern. Der Kondensationskolben stand im Eisbad.

Das klare Destillat wurde in 3 ml H_2O aufgenommen und vorsichtig, unter ständigem Rühren, mit 0,5 N NaOH auf pH 4,0 eingestellt (Eisbad).

Danach wurde die Lösung im Rotationsverdampfer auf etwa 0,2 - 0,3 ml eingeeengt. Es bildeten sich keine Kristalle. Nach Zugabe von 1,3 ml kalten Acetons wurde die Lösung 15 Stunden in der Tiefkühltruhe (-20°C) stehengelassen. Es zeigte sich dann ein weisser, sandartiger Niederschlag. Weitere 5 ml Aceton wurden zugegeben und anschliessend auf einer Fritte abgenutscht. Der Niederschlag wurde mehrmals mit kaltem Aceton und Äther gewaschen und im Exsiccator getrocknet.

Die Ausbeute betrug 60% der bei der Inkubation entstandenen Ketosäure. Das Produkt war weiss und locker. Die Ninhydrinreaktion war ganz schwach positiv. Der α -Ketosäure-Gehalt wurde nach Friedmann u. Haugen bestimmt unter Verwendung einer Eichkurve mit α -Keto-isocaproinsäure. Danach bestand das Präparat aus reiner Ketosäure. Ein Schmelzpunkt für das Na-Salz war nicht angegeben.

C) Bestimmung von Ketosäuren in wässriger Lösung nach Friedmann u. Haugen(14) :

Ein Aliquot an wässriger Lösung einer Ketosäure und 1,5 ml Dinitrophenylhydrazin (0,1 % in 2 N HCl) wurden mit H_2O auf 3,0 ml aufgefüllt und 10 min. bei 25°C inkubiert. Anschliessend wurden 2,5 ml 2,5 N NaOH zugegeben und nochmals 10 min. bei 25°C inkubiert. Dann wurde die Extinction der Lösung bei 530m μ im Eppendorf-Photometer gemessen. Zur quantitativen Bestimmung wurde vorher eine Eichkurve angelegt.

D) Proteinbestimmung:

Proteinbestimmungen wurden entweder nach der Biuretmethode⁽¹³⁾ (66) , oder nach Warburg-Kalkar^(31,65) durch Messung der

Extinction bei 280 u. 260 m μ durchgeführt.

E) Messung der Aktivität der α -Keto-isocaproinsäure-Oxydase aus Rinderleber (Standarttest).

Eine manometrische Messung der CO₂ Entwicklung war nicht möglich, da die Umsätze zu gering waren. Es wurde deshalb 1 ¹⁴C markierte α -Ketosäure als Substrat benutzt und das radioaktive CO₂ aufgefangen und ausgezählt.

Die Inkubation wurde in Warburg-Gefäßen (Fir. Braun Messungen, Volumen = 15 ml) vorgenommen. Der Hauptraum enthielt 72 μ Mol Na-Phosphatpuffer pH 6,3 ; 1,45 μ Mol TPP und 6,4 μ Mol MgSO₄. In den Seitenarm wurden 1,5 μ Mol inaktives Kik und 38 m μ C Kik 1 ¹⁴C (= 40000 IpM) pipettiert. Die Reaktion wurde durch Einkippen des im Seitenarm befindlichen Substrats gestartet. Die Endmolaritäten waren folgende: Na-Phosphatpuffer = $3,6 \times 10^{-2}$ M/L; Kik = $0,75 \times 10^{-3}$; TPP = $0,725 \times 10^{-3}$ M/L; MgSO₄ = $3,2 \times 10^{-3}$ M/L. Das Gesamtvolumen betrug 2,0 ml.

In den Mitteleinsatz des Hauptraumes wurde ein gefaltetes Filterplättchen (Whatman W31 ET ; 1,5 x 2,0 cm) gesteckt, das mit 0,05 ml 4 N KOH getränkt war (4). Von ungereinigtem Enzym wurde 1,0 ml eingesetzt. Nach der Anreicherung genügten 5-10 mg Protein pro Ansatz.

Im Standarttest wurde 1,5 Stunden in der Warburg-Apparatur (Schüttelfrequenz = 90/Min) bei 37°C inkubiert. Die Atmosphäre war Luft. Bei einzelnen Bestimmungen wurde über einen kürzeren Zeitraum inkubiert. Eine Begründung dafür wird unten gegeben. Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem "Liquid Scintillation Spectrometer" der Firma Pakard. Dazu wurden die Filterplättchen, auf denen das CO₂ aufgefangen worden war, in ein Zählgläschen überführt und 10 ml folgender Scintillationsflüssigkeit zugegeben:

800 ml Toluol (tech., destilliert) + 400 ml Äthanol (wasserfrei) + 4,8 g PPO (2,5-Diphenyloxazol) + 0,12 g Dimethyl - POPOP (1,4-bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)-benzol).

Geräteeinstellung:

Gain : 28%

Window : 70 - 1000

F) Heterozygotentest für die Ahornsirup-Krankheit (16, 17).

1. Herstellung der Lösungen:

- a) 200 ml 2,7 %iges Na-Citrat + 100 ml 10 %ige Makrodex-Lösung.
- b) 100 ml 0,9 %ige NaCl Lösung, die mit 0,5 N Trispuffer (pH 7,4) auf pH 7,4 eingestellt wurde.
- c) 75 ml 0,1 M Tris/HCl - Puffer pH 7,4 + 8 ml 0,1 M MgSO_4 + 2 ml 0,1 M Thiaminpyrophosphat.
- d) 2,5 ml 0,01 M α -Ketoisocaprönsäure + 16 μC α -Ketoisocaprönsäure 1 ^{14}C in 6 ml aqua dest. aufgenommen.
- e) 4 N KOH

2. Gewinnung der Leukozyten:

Durch Venenpunktion gewonnenes Vollblut wurde im Verhältnis 8 : 3 mit Lösung a versetzt und gut gemischt in 10 ml Messzylinder gegeben. Nach etwa zweistündigem Absetzen der roten Blutkörperchen wurde der Überstand abgenommen und die darin enthaltenen Leukozyten abzentrifugiert (10 min bei 1000g). Die Leukozyten wurden dann in einer kleinen Menge (ca. 3 ml) Lösung b aufgenommen und gezählt. Alle Vorgänge wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt. Aus 40 ml Blut liessen sich auf diese Weise sehr schonend Leukozyten für drei bis vier Bestimmungen gewinnen.

3. Testansatz:

Die Umsetzung wurde in Warburg-Gefässen (Firma Braun Melsungen) durchgeführt (Gesamtvolumen etwa 15 ml)

Birne : 0,085 ml Lösung d ; Hauptraum : 0,315 ml Lösung c , 16×10^6 Leukozyten, ad 2,0 ml mit Lösung b .

Einsatz : gefaltetes Filterplättchen (Whatman W 31 ET, Grösse: 1,5x2,0 cm) mit 0,05 ml Lösung e .

Die Endkonzentrationen im einzelnen Testansatz waren also: $1,4 \times 10^{-2}$ M Tris/HCl-Puffer pH 7,4; $1,5 \times 10^{-2}$ M MgSO_4 ; $1,25 \times 10^{-4}$ M α -Ketoisocaprönsäure ; 170000 IpM α -Ketoisocaprönsäure 1 ^{14}C ; $3,7 \times 10^{-3}$ M Thiaminpyrophosphat ; 16×10^6 Leukozyten. Gesamtvolumen = 2,0 ml

4. Inkubation:

Die Reaktion wurde mit dem Substrat (α -Ketoisocaprönsäure) gestartet. Es wurde 3 Stunden bei 37°C inkubiert; die Atmosphäre war Luft; Schüttelfrequenz: 90/min .

5. Auszählung der Proben:

Die Auszählung erfolgte in gleicher Weise, wie oben im Standardtest für die α -Keto-isocapronsäure-Oxydase aus Rinderleber beschrieben wurde.

G) Messung der α -Keto- β -methylvaleriansäure-Oxydase in Rinderleber:

Die Technik war die gleiche, die zur Messung der α -Ketoisocapronsäure-Oxydase angewandt wurde. Der Coenzymbedarf war allerdings grösser. Inkubationsansatz:

80 μ Mol Na-Phosphatpuffer pH 7,5
1,5 μ Mol α -Keto- β -methylvaleriansäure
50 m μ C α -Keto- β -methylvaleriansäure 1 14 C
1 μ Mol NAD 1,45 μ Mol TPP
1 μ Mol CoA 6,4 μ Mol MgSO₄
10 μ Mol Cystein (neutralisiert)
Gesamtvolumen = 2,0 ml

Ergebnisse

I. Teil

Biochemische Untersuchungen an der a-Keto-isocaprönsäure-Oxydase aus Rinderleber.

1. Aktivität der a-Keto-isocaprönsäure-Oxydase in Lebern verschiedener Tierspezies u. in verschiedenen Organen d. Rindes.

Bei allen untersuchten Tieren lag die Aktivität in der gleichen Grössenordnung. Das Rind zeigte die höchste, das Pferd die niedrigste Aktivität (Tab. I). Beim Rind betrug die individuelle Schwankungsbreite 20% des Mittelwertes aus einer grösseren Anzahl von untersuchten Lebern. Bei anderen Tierspezies wurde die individuelle Schwankungsbreite nicht untersucht.

Tab. I Aktivität der a-Keto-isocaprönsäure-Oxydase in Lebern verschiedener Tierspezies.

Tier	muMol Kik/mg Prot./1,5h
Hammel	2,3
Rind	2,5
Schwein	1,8
Pferd	1,6

Rinderleber hatte auch verglichen mit anderen Organen dieses Tieres die höchste spezifische Aktivität an a-Keto-isocaprönsäure-Oxydase. Während die spezifische Aktivität in der Niere etwa halb so gross war, kamen in Herz- und Skelettmuskulatur nur verschwindende Mengen dieses Enzyms vor. - Im Gegensatz dazu konnten Pyruvat- und a-Ketoglutarat Oxydase im Herzen in grossen Mengen nachgewiesen werden.

Tab. II Aktivität der a-Keto-isocaprönsäure-Oxydase in verschiedenen Organen des Rindes.

Organ vom Rind	muMol Kik/mg Prot./1,5h
Leber	2,5
Niere	1,45
Herz	0,08
Skelettmuskel	0,1

2. Anreicherung der α -Keto-isocaprönsäure-Oxydase aus Rinderleber.

- a) Eine frische, gut ausgeblutete Leber wurde in kleine Stücke geschnitten, die danach unter fließendem Wasser möglichst weitgehend von Blut gereinigt wurden. Die Stücke wurden anschliessend durch den Fleischwolf gedreht und die Masse in der Tiefkühltruhe bei -20°C eingefroren. - Ein Waschen nach der Zerkleinerung im Wolf war nicht mehr möglich. Die Masse war zu wenig konsistent. Zwar stieg die spez. Aktivität danach an, aber der Verlust an Gesamtmasse und Gesamtaktivität war sehr gross.
- Zur weiteren Verarbeitung sollten nur Lebern verwandt werden, die mindestens 2 Monate eingefroren waren. Andernfalls sind die Anreicherungen schlecht und unterschiedlich. Die in Tab. III angegebenen Werte wurden mit Lebern erzielt, die ca. 4 Monate eingefroren waren. - Die Enzymaktivität schien in diesem Zustand praktisch unbegrenzt haltbar zu sein.
- b) 320 g halb aufgetauter Leber wurden zusammen mit 650 ml eiskaltem Na-Phosphatpuffer (0,01 M pH 7,2) zwei Minuten im Starmix homogenisiert und anschliessend eine halbe Stunde stehen gelassen. Danach wurde das Homogenat eine Stunde zentrifugiert (Sorvall, gr. Rotor = 5,75 inch, 8500 RpM = 11700 g, $T = 0^{\circ}\text{C}$). Nach einer Stunde wurde der Überstand vorsichtig abgegossen, bis das grünliche, dickflüssige Sediment erschien. Dieser Rohsaft hatte noch weitgehend den Charakter einer Suspension. Er sah rotbraun und trübe aus; das Volumen betrug etwa 700 ml.
- c) Es wurde im Eisbad unter ständigem Rühren 2 N $\text{CH}_3\text{-COOH}$ zugegeben bis ein pH von 5,2 erreicht war (der pH des Rohsaftes betrug 6,6 - 6,8). Wiederum wurde eine Stunde zentrifugiert (gr. Rotor 5,75 inch, 8500 RpM = 11700 g, $T = 0^{\circ}\text{C}$). Der nun klare, rötlichbraune Überstand wurde weiterverarbeitet, das grünliche Sediment wurde verworfen. Zum Überstand wurden tropfenweise 2 N NaOH zugegeben bis die Lösung auf einen pH von 7,0 eingestellt war. Das Volumen betrug 520 - 580 ml. Auf dieser Stufe konnte das Enzym wochenlang ohne nennenswerten Aktivitätsverlust eingefroren werden. Die

spez. Aktivität stieg sogar etwas an nach mehrmaligem Auftauen, da eine Menge inaktives Protein ausfiel.

- d) 1. Äthanol-fällung: zu je 200 ml der oben genannten Enzym-lösung wurden 60 ml tiefgekühlten, vergällten, 99%igen Alkohols (-20°C) gegeben (innerhalb von ca. 6-8 Minuten). Die gesamte Prozedur wurde in einem Kühlaggregat der Firma Colora vorgenommen. Die Temperatur betrug $-14^{\circ} - -16^{\circ}\text{C}$. Nach Zugabe des Alkohols wurde 20 Minuten zentrifugiert (Servall, kleiner Rotor 4, 2,5 inch, 17000 Rpm = 34800 g, $T = -20^{\circ}\text{C}$).

Der Rückstand wurde verworfen. Zu dem klaren, stark rot gefärbten Überstand (Volumen = 250 ml) wurden weitere 100 ml Alkohol innerhalb von etwa 10 Minuten unter starkem "Plümpern" zugegeben. Danach wurde wiederum zentrifugiert (Servall, kl. Rotor, 17000 Rpm, $T = -20^{\circ}\text{C}$). Der weinrote Überstand wurde verworfen. Das Sediment wurde in eiskaltem aqua dest. aufgenommen, möglichst weitgehend gelöst und nochmals 15 Minuten im kleinen Rotor der Servall-Zentrifuge bei 0°C zentrifugiert. Das jetzt entstandene Sediment und die mehr oder weniger ausgebildete Lipidschicht wurden ebenfalls verworfen.

Die Enzym-lösung war nun klar und hatte eine rötlich-braune, manchmal aber auch eine bräunlich-grüne Farbe. Die Lösung wurde auf eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml eingestellt. Das Volumen betrug 280 - 320 ml. Auch auf dieser Stufe konnte das Enzym wochenlang ohne Verlust eingefroren werden.

- e) 2. Äthanol-fällung: Die Fällung wurde bei -12°C durchgeführt - bei tieferer Temperatur gefror ein Teil der Lösung und die Konzentrationsverhältnisse wurden unübersichtlich. Zu je 200 ml Lösung (10 ml/mg Proteinkonzentration) wurden langsam innerhalb von 7-8 Minuten 35 ml Alkohol (-20°C) eingeplümpert. Danach wurde 20 Minuten im kl. Rotor der Servall zentrifugiert (17000 Rpm; -20°C). Der Rückstand und die Lipidhaut wurden verworfen. Zu dem mehr oder weniger trüben Überstand (Vol. = 220 ml) wurden langsam weitere 77 ml Alkohol zugegeben - innerhalb von ca. 12 Minuten. Dann wurde wiederum wie oben angegeben zentrifugiert. Der meist noch trübe Überstand wurde anschliessend verworfen. Das Sediment wurde in 0,01 M Na-Phosphatpuffer pH 7,0 aufgenommen. Das Volumen betrug ca. 30 ml, der Proteingehalt

etwa 15 mg/ml. In Tab.III sind die Daten der einzelnen Schritte noch einmal zusammenfassend aufgeführt.

Tab.III Zusammenfassung der Anreicherungsmethode für die a-Keto-isocaprinsäure-Oxydase aus Rinderleber.

	Volumen ml	Aktivität IpM/ml	Prot.Gehalt mg/ml	Spez.Akt. uMol/mg/I.5h	Ausbeute %
Homogenat	700	3800	58,0	2,7	100
Säurefällung	550	2500	30,0	3,2	52
I.Äthanol-fällung	300	5300	10,0	21,0	60
2.Äthanol-fällung	30	19000	15,0	52,5	20

Die erhaltene Enzymlösung hatte eine gelbe bis gelb-grüne Farbe. Die spez. Aktivität betrug etwa das 20 fache des rohen Lebereluates. Das Enzym konnte wochenlang eingefroren werden, ohne dass ein signifikanter Aktivitätsverlust festgestellt werden konnte.

In der Ultrazentrifuge ergaben sich zwei etwa gleichgrosse Fraktionen von 5,4 und 7,3 S, was darauf hindeutet, dass die benutzte Enzymlösung noch relativ unrein war.

Eine nicht ganz so gute Anreicherung erhielt man durch Kombination einer Ammoniumsulfat-Fällung mit einer Äthanol-fällung: Nach der Säurefällung wurde eine Ammoniumsulfat-Fraktionierung durchgeführt, anschliessend über Nacht dialysiert und dann eine Äthanol-fällung angeschlossen. Die Ergebnisse waren nicht so gut und das Verfahren umständlicher als das oben beschriebene.

3. Säulenchromatographie angereicherter a-Keto-isocaprinsäure-Oxydase.

Weitere Anreicherungsversuche mit Ionenaustauschern und Geladsorptions-Verfahren hatten keinen Erfolg. Alle diese Methoden scheiterten letzten Endes an der ausserordentlich geringen Aktivitätsausbeute bei der Elution. Es wurden sowohl Säulen aus DEAE - Zellulose als auch Säulen aus Ca-Phosphatgel (mit P - Zellulose) angewandt. Auch direktes Einrühren von Ca-Phosphat- und Aluminium c-gamma-Gel in eine Enzymlösung und anschliessende Elution (durch Änderung des pH-Wertes oder der Ionenstärke) wurde durchgeführt. Als Beispiel sei ein Versuch angegeben, der in der Auftrennung von angereicherter Kik-Oxydase

an einer kleinen DEAE-Zellulose-Säule beruhte:

Frische DEAE-Zellulose wurde mehrere Tage mit aqua dest. gewaschen (alle zwei Stunden wurde das Wasser dekantiert und erneuert) und dann zu einer Säule "gepackt" (Durchmesser: 1,0 cm; Höhe: 17 cm). Sechs Stunden wurde bei 7° C mit 0,02 M Na-Phosphatpuffer pH 7,4 equilibriert. Anschliessend wurden 4 ml Enzym (Anreicherungsstufe: 1.Äthanol-fällung) auf die Säule gegeben (Spez. Aktivität: 20; Gesamtprotein: 19,6 mg; Gesamtpulse (Radioaktivität) pro 1,5 h: 13500) und dieses langsam innerhalb von zwei Stunden einziehen gelassen.

Mit 0,02 M Na-Phosphatpuffer wurde zunächst nachgewaschen bis der Proteinwert unter 0,1 mg/ml Eluat gesunken war (Proteinbe-

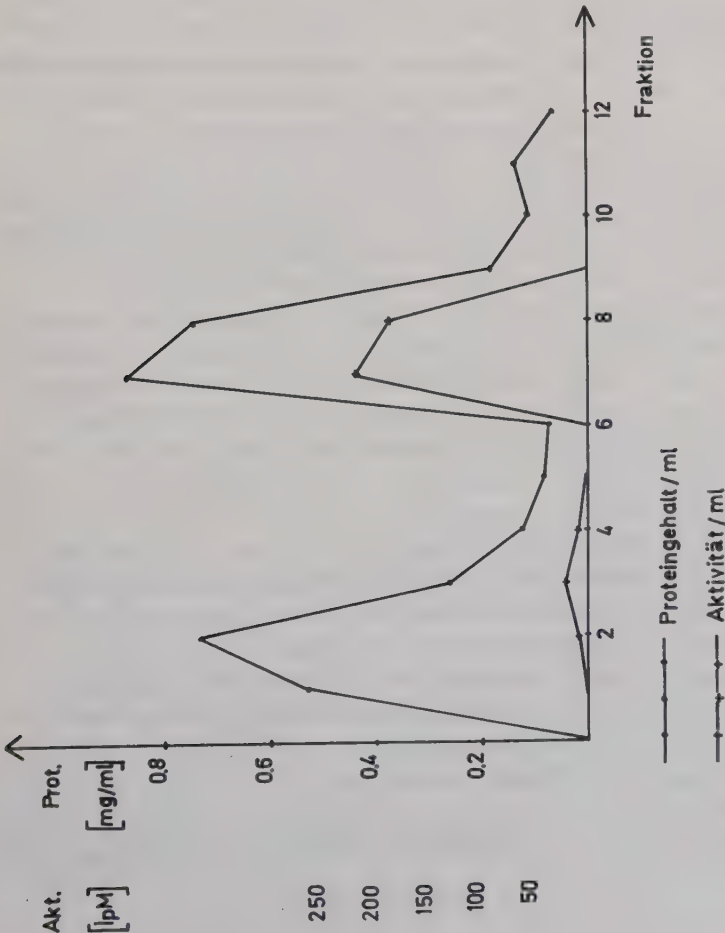


Abb. 3 Fraktionierung auf einer Säule aus DEAE-Zellulose (nach der 1.Äthanol-fällung).

stimmung nach Warburg-Kalkar). Anschliessend wurde hinter-
einander zuerst mit 0,1 M Na-Phosphatpuffer pH 7,4 + 1%
Ammoniumsulfat, dann mit 0,1 M Na-Phosphatpuffer pH 7,4 +
5% Ammoniumsulfat eluiert. Nach dieser Behandlung war alles
auf die Säule gegebene Protein wieder eluiert. Die Gesamt-
ausbeute an Aktivität betrug dagegen nur 10%. Die höchste
spez. Aktivität lag bei 10 (spez. Aktivität des auf die Säule
gegebenen Enzyms: 20).

Abbildung 3 zeigt eine graphische Darstellung dieses Versuches.
Die drei Proteingipfel entsprechen den drei benutzten Elu-
tionspuffern. Der Haupt-Aktivitätsgipfel fällt mit dem zweiten
Proteingipfel zusammen. Mit dem dritten Elutionspuffer liess
sich keine Aktivität mehr, wohl aber noch eine geringe Menge
Protein aus der Säule gewinnen. Es ist deshalb sehr unwahrschein-
lich, dass noch aktives Enzymprotein der α -Keto-isocapro-
säure-Oxydase auf der Säule zurückgeblieben ist.

Ausserordentlich viel Mühe wurde auf Versuche verwandt, Kik-
Oxydase mittels Ca-Phosphat-Gels weiter anzureichern. Es sei
deshalb kurz beschrieben, wie die Ca-Phosphat-Gel Säulen vor-
bereitet wurden und wie üblicher Weise eluiert wurde.

Da der Hydroxylapatit alleine zu fest zusammensintert, sodass
kein genügender Durchfluss zustande kommt, wurden 3 g Ca-Phos-
phat-Gel (Firma Sigma) mit 20 g P-Zellulose (Firma Schleicher &
Schüll) in aqua dest. aufgeschwemmt (40) und mit der Wasser-
strahlpumpe 15 Minuten die gebundene Luft abgesaugt. Nach dem
Stopfen der Säule wurde diese für 48 Stunden mit 0,01 M
Na-Phosphatpuffer pH 7,4 gespült.

P-Zellulose ist ein grobflockiges Material mit nur sehr ge-
ringer Austauschkapazität. Durch Auflockerung des Phosphatgels
gewährleistet es einen genügenden Durchfluss ohne die Eigen-
schaften des Gels merklich zu beeinflussen.

Auf eine solche Säule wurden bis zu 500 mg Protein gegeben,
ohne dass eine Überladung auftrat. Ein Beispiel einer typi-
schen Elutionsfolge sei kurz skizziert:

Spülen mit 0,01 M Na-Phosphatpuffer pH 7,4; Elution mit
Na-Phosphatpuffer 0,03 M pH 7,4; Gradient von 0,03 bis 0,07 M
des gleichen Puffers; schliesslich wurde noch ein Gradient

angelegt von Na-Phosphatpuffer 0,075 M pH 7,4 bis Na-Phosphatpuffer 0,2 M pH 7,4 + 5% Ammoniumsulfat + 5% Glycerin - letzteres hat eine eluierende und stabilisierende Wirkung auf die Kik-Oxydase.

Eine solche Säulenchromatographie dauerte ca. 40 - 48 Stunden. Obwohl sich differenzierte Fraktionen bildeten und schliesslich das gesamte Protein eluiert war, zeigte keine Fraktion eine höhere spez. Aktivität als die Ausgangslösung. Dies lag an der sehr geringen Aktivitätsausbeute, die etwa 12% betrug und stets auf eine Anzahl von Fraktionen verteilt war. Verschiedene Variationen erbrachten kein besseres Resultat.

4. pH - und Pufferabhängigkeit von α -Keto-isocaprone-Oxydase.

Die Messungen wurden wie in "Methoden" beschrieben durchgeführt. Um unspezifische Denaturierungen auszuschliessen, wurde nur 20 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurden die pH-Werte mit der Mikroelektrode nachgemessen. Abbildung 4 zeigt die Bestimmung des pH Optimums für Na-Phosphatpuffer und für Citrat-Phosphat-Boratpuffer. Für beide Gemische ergab sich ein pH Optimum von 6,3.

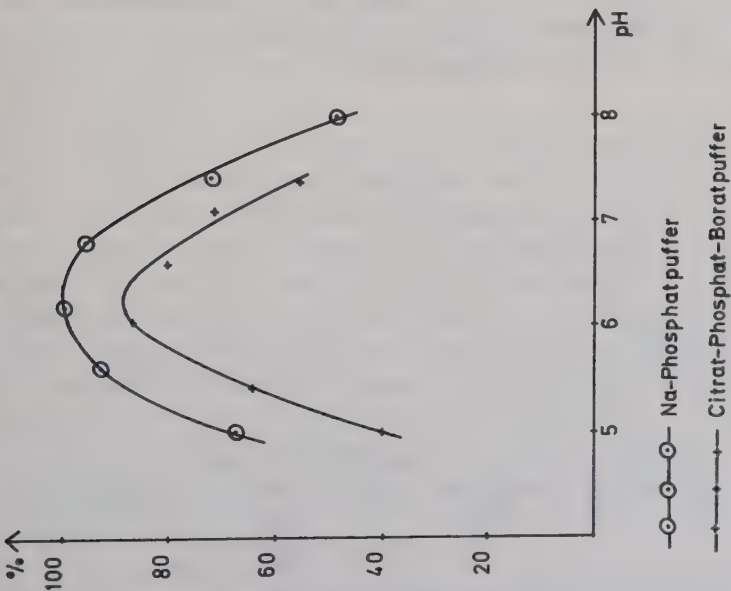


Abb. 4 pH-Optimum für α -Keto-isocaprone-Oxydase.

Tab.IV Pufferabhängigkeit von α -Keto-isocaprinsäure-Oxydase(Phosphat=100%).

Puffer	pH	%
Phosphat	6,3	100
Citrat	6,3	93
Citrat/Phosphat	6,3	93
Citrat/Phosphat/Borat	6,3	87
Tris/HCl	7.4	96

Als optimaler Puffer erwies sich Na-Phosphatpuffer; die Unterschiede an Aktivität in anderen Puffern waren aber gering. Erwähnenswert ist die Tatsache, dass in Tris/HCl Puffer pH 7,4 fast die gleiche Aktivität gemessen wurde wie in Na-Phosphatpuffer im Optimum (pH 6,3). In Tab.IV sind die Ergebnisse für verschiedene Puffer zusammengefasst. Die Aktivität in Na-Phosphatpuffer im pH Optimum von 6,3 wurde gleich 100 % gesetzt.

5. Aktivität der α -Keto-isocaprinsäure-Oxydase in Abhängigkeit von der Zeit.

Inkubiert wurde wie angegeben bei 37°C in Na-Phosphatpuffer pH 6,3. Es wurden 5 mg Enzym einer spez. Aktivität von 51 eingesetzt. Das mit KOH getränkte Filterplättchen wurde in den ersten 30 Minuten alle 10 Minuten, später alle 30 Minuten gewechselt. Vor dem Start wurde 10 Minuten vorinkubiert und die Temperatur im Ansatz nachgemessen.

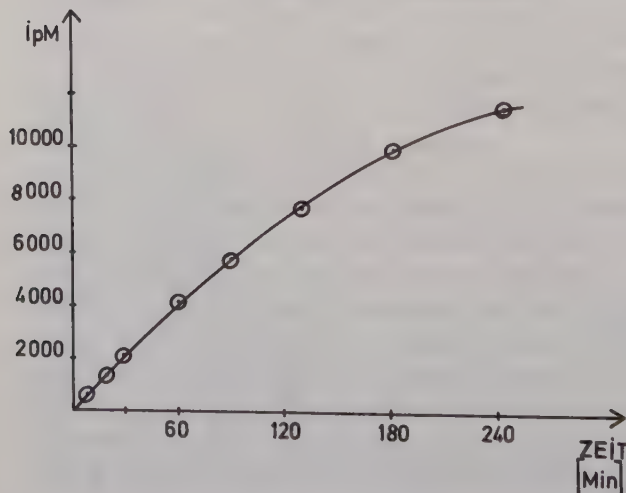


Abb.5 Aktivität der α -Keto-isocaprinsäure-Oxydase in Abhängigkeit von der Zeit.

In den ersten 10 Minuten wurden stets etwas geringere Werte (85%) gemessen als in den folgenden 10 Minuten. Wahrscheinlich handelte es sich um einen Verdünnungseffekt des freigesetzten radioaktiven CO_2 mit dem schon in der Lösung vorhandenen. Abbildung 5 zeigt, dass die Reaktionsgeschwindigkeit eine Stunde fast linear verläuft. Nach der unten aufgeführten Michaelis Konstanten liegen alle Punkte in Sättigung.

6. Bestimmung des Reaktionsgleichgewichtes im Standardtest

Um eine wahre Aussage über die Reaktionsgeschwindigkeit zu erhalten, darf das Konzentrationsverhältnis von Substrat : Endprodukt zu keinem Zeitpunkt einer Inkubation in der Nähe des Reaktionsgleichgewichtes liegen. Vor allem bei starker Substratuntersättigung kann sich bei ungünstigen Verhältnissen eventuell sehr schnell die Reaktion dem Gleichgewicht nähern. Dann wird eine geringere Reaktionsgeschwindigkeit als sie der Wirklichkeit entspricht vorgetäuscht.

Die Versuchsanordnung entsprach der des Standardtestes; nur wurden statt $1,5 \mu\text{Mol Kik}$ $200 - 500 \mu\text{Mol Kik}$ pro Ansatz eingesetzt, um das Gleichgewicht schneller zu erreichen. Nach 4 Stunden Inkubation wurde das Filterplättchen gewechselt und nach Zugabe von zusätzlich $0,5 \text{ ml Enzym}$ nochmals 1 Stunde inkubiert. Stets war aber das Gleichgewicht nach 4 Stunden schon erreicht, und die Umsätze in der 5. Stunde entsprachen nur noch der Aktivität des Kontrollwertes.

Das Gleichgewicht lag bei 65-69% Kik-Umsatz. Obwohl Isovaleriansäure, auf deren Nachweis in dieser Arbeit nicht eingegangen wird, unter den gewählten Bedingungen das Reaktionsendprodukt ist, liess sich keine Hemmung der Reaktionsgeschwindigkeit nachweisen, wenn man ein Gemisch Iso-Valeriansäure : Kik von 2 : 1 inkubierte. Isovaleraldehyd dagegen zeigte den erwarteten Hemmeffekt. Dieser Aldehyd ist aber so flüchtig, dass sich während der Inkubation keine definierten Konzentrationsverhältnisse ergaben.

$0,005 \text{ M Arsenit}$ im Inkubationsansatz hatte keinen Einfluss auf das Gleichgewicht.

7. Bestimmung der Michaelis-Konstante von a-Keto-isocapro- säure-Oxydase.

Nach der ursprünglichen Michaelis-Menten Theorie entspricht die Michaelis-Konstante (K_M) der Dissoziationskonstanten des Enzym-Substratkomplexes, die auf Grund der Gleichung:

$$v = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_M}{S}}$$

praktisch als Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit in Erscheinung tritt. Man weiss aber heute, dass in vielen Fällen die Dissoziationskonstante des Enzym-Substratkomplexes einerseits und die Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit andererseits nicht identisch sind. Es ist heute üblich, die Bezeichnung "Michaelis-Konstante" nur noch für die Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit zu gebrauchen. Für die Dissoziationskonstante des Enzym-Substratkomplexes schlagen Dixon u. Webb (9) die Benennung K_S ("Substrat-Konstante") vor.

Der Inkubationsansatz und das Auszählen der Proben wurde wie im Abschnitt "Methoden" angegeben durchgeführt. Es wurden bei verschiedenen K_M -Bestimmungen verschiedene Mengen von Enzym eingesetzt je nach der spez. Aktivität der benutzten "Enzym-charge" (zwischen 5 und 10 mg Protein pro Ansatz). Die spezifische Aktivität des eingesetzten markierten Substrats war doppelt so hoch wie im Standardansatz.

Nach 5 Minuten Vorinkubation wurde durch Einkippen des im Seitenarm des Warburggefässes befindlichen Substrats gestartet. Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten. In den niedrigen Substratkonzentrationen wurde trotz der kurzen Inkubationszeit bis zu 40 % des eingesetzten Substrats umgesetzt. Einerseits näherte sich in diesen Fällen die Reaktion bereits dem Gleichgewicht, andererseits entsprach die Endkonzentration des Substrats bei weitem nicht mehr der Anfangskonzentration, wie das zumindest theoretisch für die K_M -Bestimmung verlangt wird.

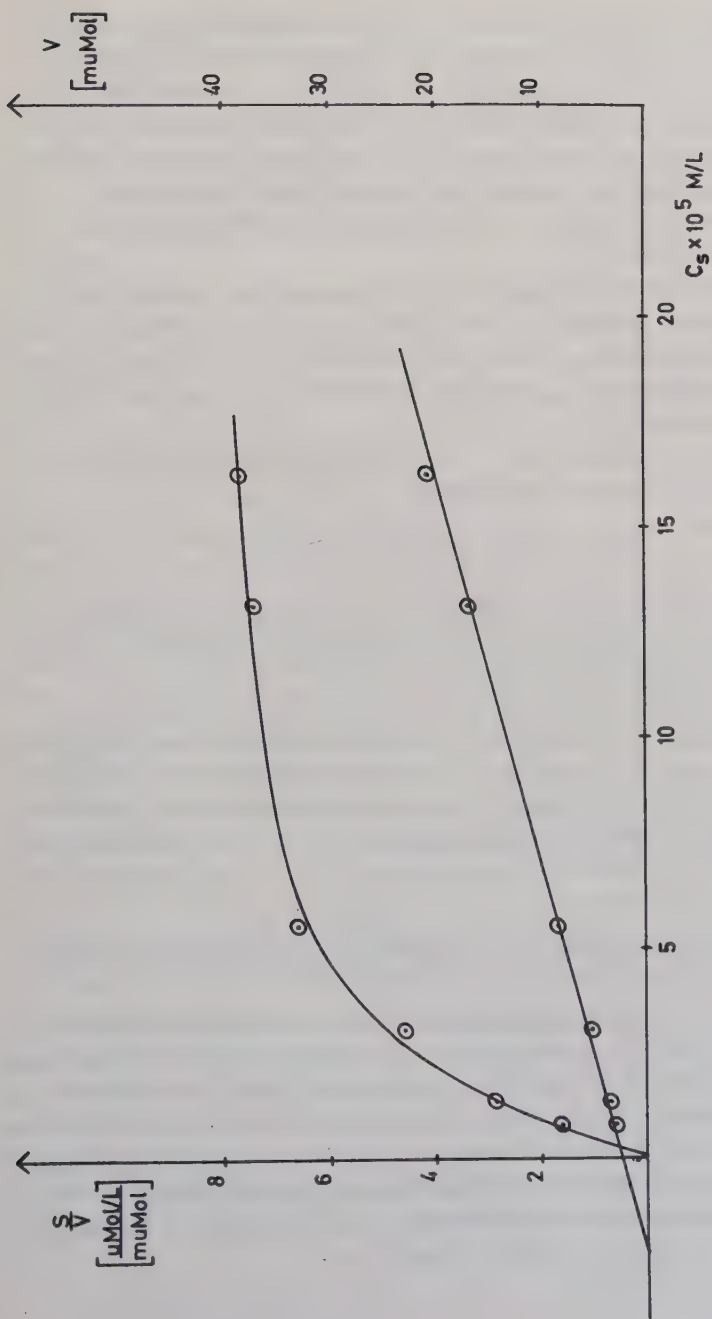


Abb. 6 Michaelis-Konstante für α -Keto-isocaproonsäure an der α -Keto-isocaproonsäure-Oxydase; links nach Lineweaver-Burk, rechts als Sättigungskurve nach Michaelis-Menten.

Um wenigstens den letzteren Faktor einigermaßen zu berichtigen, wurde als "Istkonzentration" im Diagramm der arithmetische Mittelwert zwischen Anfangs- und Endkonzentration aufgetragen. Zwar stellt dies eine Vereinfachung der wahren Verhältnisse dar, aber praktisch erhält man auf diese Weise eine Michaelis-Konstante, die hinsichtlich Genauigkeit und Reproduzierbarkeit den Möglichkeiten des verwandten Testes entspricht.

Eine exakte Korrekturmethode hat Henri (23) angegeben. Er schlägt eine Integration der normalen Michaelis-Menten Gleichung vor und zwar zwischen dem Zeitpunkt T_0 mit der Substratkonzentration S_0 und dem Zeitpunkt T_x mit der Substratkonzentration S_x .

Aus vielen Messungen mit vielen verschiedenen Enzymchargen ergab sich folgender Mittelwert:

$$K_M = 2,1 \pm 0,5 \times 10^{-5} \text{ Mol/Liter}$$

Dieser Wert ergab sich sowohl in der Enzymsättigungskurve nach Michaelis-Menten, als auch mittels der üblicheren Auftragungsmethode von Lineweaver u. Burk.

Eine von vielen Messungen ist in Abbildung 6 dargestellt. Dabei ist auf der Abszisse S (Substratkonzentration) aufgetragen. Auf der linken Ordinate ist der Quotient S/V angegeben, wodurch ein modifiziertes Lineweaver-Burk Diagramm entsteht. Rechts ist V (Geschwindigkeit) für die Enzymsättigungskurve nach Michaelis-Menten abzulesen.

8. Bestimmung von Inhibitorkonstanten für verschiedene Inhibitoren der α -Keto-isocaproinsäure-Oxydase.

Die Inhibitorkonstante (K_I) ist die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes. Sie entspricht also definitionsgemäss der für das Substrat geltenden K_s , über deren Bedeutung und Beziehung zur Michaeliskonstanten oben schon berichtet wurde. Die Inhibitorkonstante ist somit ebenfalls gleich dem reziproken Wert der Affinität von Inhibitor zum Enzym. Man unterscheidet zwei Haupttypen der Inhibition: den kompetitiven und den nicht kompetitiven Typ.

Bei der kompetitiven Hemmung greift der Inhibitor am Substratbindungsort an, während bei dem nicht kompetitiven Typ der Hemmstoff an einer benachbarten Stelle gebunden wird. Dabei wird zwar nicht die Bindung des Substrates, wohl aber dessen Umwandlung am Enzym verhindert. Ausser den "reinen Typen" unterscheidet man noch teilweise kompetitive, teilweise nicht kompetitive und - wahrscheinlich am häufigsten - sogenannte Mischtypen.

Durch Zusatz eines kompetitiven Inhibitors wird die K_M des Substrates vergrössert. Der nicht kompetitive Inhibitor hat dagegen keinen Einfluss auf die Michaelis-Konstante. Er verursacht vielmehr eine Verkleinerung von V_{max} . Charakteristisch für den "Mischtyp" ist die Tatsache, dass sowohl die K_M als auch V_{max} verändert werden.

Im allgemeinen muss man bei strukturell nahe verwandten Verbindungen eine stärkere Hemmung erwarten als bei weniger ähnlichen Verbindungen. Gezielte Inhibition mit systematisch abgewandelten Inhibitoren lässt oft Aussagen über das aktive Zentrum des betreffenden Enzyms zu. Voraussagen über den zu erwartenden Hemmtyp lassen sich nur selten mit Sicherheit machen. Dies zeigte sich auch bei den hier durchgeführten Untersuchungen.

Die Testbedingungen entsprachen den in "Methoden" angegebenen Vorschriften. Es wurde 15 Minuten inkubiert; die spezifische Aktivität des radioaktiven Kik war doppelt so hoch wie im Standardtest. Bei drei verschiedenen Substratkonzentrationen wurde die Inhibition mit variierter Menge von Hemmstoff gemessen. Die Substratkonzentrationen lagen alle in Untersättigung:

a-Keto-isocaprönsäure: $5 \times 10^{-5} \text{ M/L}$; $2,5 \times 10^{-5} \text{ M/L}$; $1,25 \times 10^{-5} \text{ M/L}$. (Endkonzentration)

Die Inhibitorkonstanten wurden graphisch nach Dixon (11) und Hunter & Downs (10) ermittelt.

Bei der Methode nach Dixon wird $1/V$ gegen C_I (Inhibitorkonzentration) aufgetragen. Die Messpunkte wurden auf folgende Weise erhalten:

In den oben genannten Substratkonzentrationen wurde mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen inkubiert. Es ergaben sich

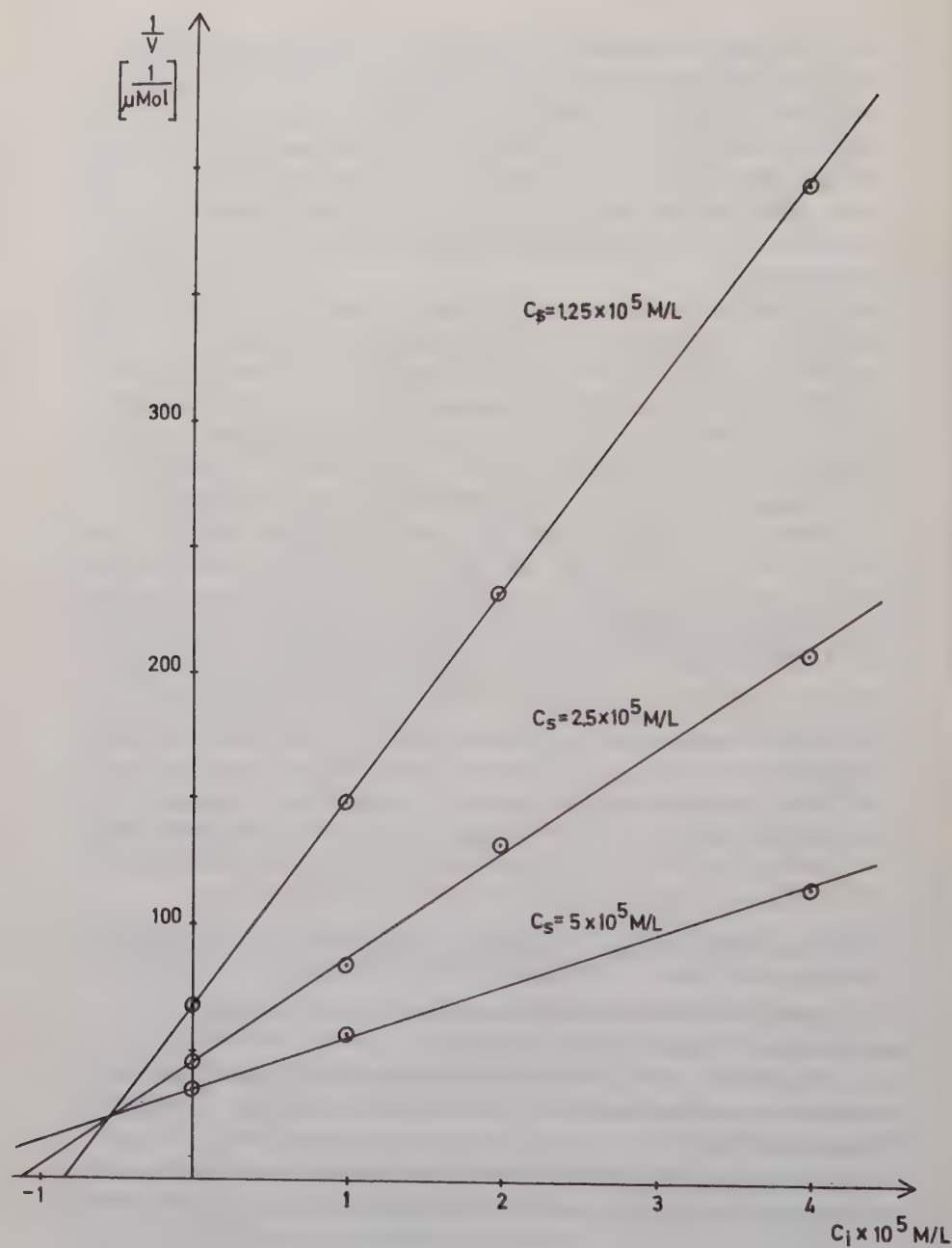


Abb.7 Inhibitorkonstante von α -Keto- β -methylvaleriansäure (nach Dixon).

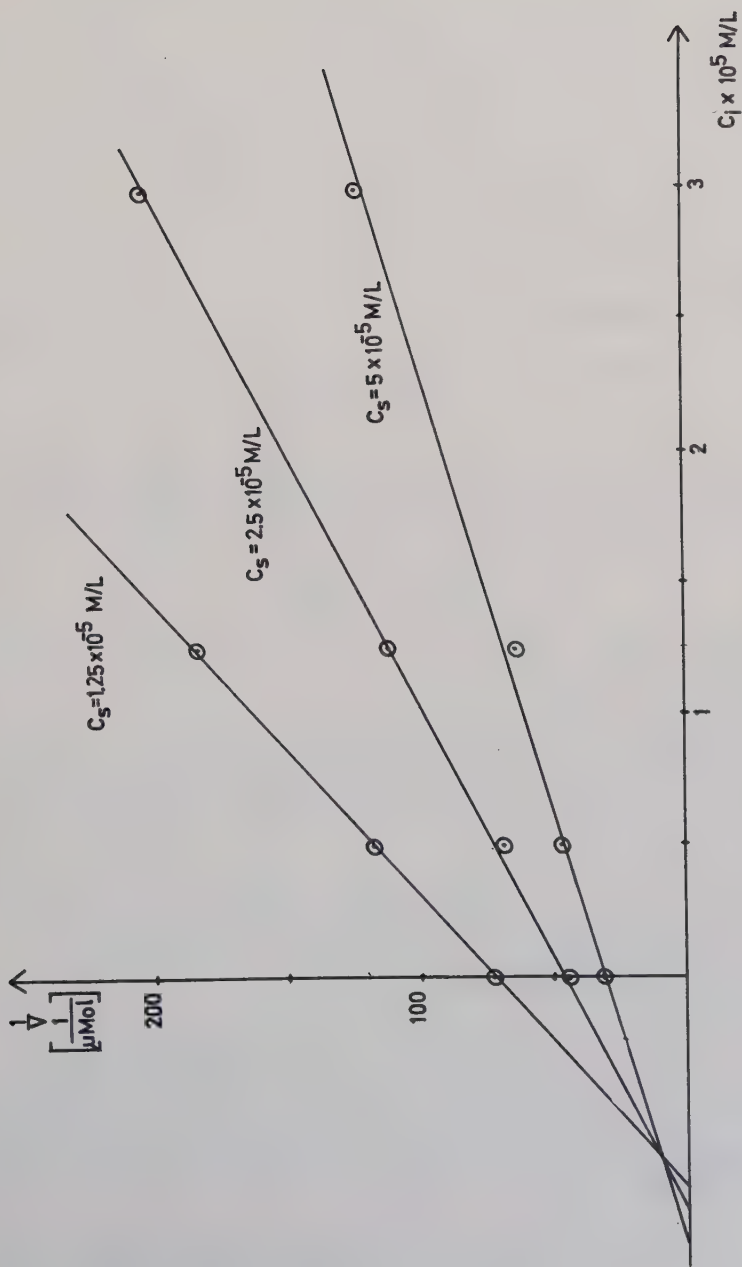


Abb. 8 Inhibitor-konstante von α -Keto-isovaleriansäure (nach Dixon).

drei Geraden bei der graphischen Darstellung. Jede Gerade war durch vier Messpunkte festgelegt: 1.) kein Inhibitor = $V_{\max}$ für die gewählte Substratkonzentration; 2.) 3.) und 4.) drei verschiedene Inhibitorkonzentrationen.

Die Abszisse des Schnittpunktes der drei Geraden ergibt den negativen Wert der K_I . Liegt der Schnittpunkt auf der Abszisse so ist die Hemmung nicht kompetitiv, liegt er über der Abszisse, dann besteht kompetitive Inhibition.

Bei der Bestimmung nach Hunter u. Downs wird folgendermassen aufgetragen:

$$\text{Abszisse : } C_{\text{Substrat}} \quad \text{Ordinate : } \frac{a}{1-a} \times C_{\text{Inhibitor}}$$

a ist der Quotient aus: $\frac{V_{\text{mit Inhibitor}}}{V_{\text{ohne Inhibitor}}}$

Es ergibt sich jeweils eine Gerade, die die y-Achse im Punkt K_I schneidet. Bei der kompetitiven Hemmung hat die Gerade die Steigung K_I/K_M , sodass sich folgende lineare Funktion ergibt:

$$C_I \times \frac{a}{1-a} = K_I + \frac{K_I}{K_M} \times C_S$$

Bei nicht kompetitiver Hemmung ist die Gerade eine Parallele zur x-Achse im Abstand K_I .

Besonders geeignet zur Feststellung des Hemmtyps ist die Auftragung im Lineweaver-Burk Diagramm ($1/V$ gegen $1/S$). Vor allem die "Mischtypen", die mit den genannten Methoden häufig nicht erfasst werden, lassen sich hierdurch einwandfrei identifizieren.

Tabelle V zeigt die gewählten Inhibitorkonzentrationen. Tabelle VI gibt eine Zusammenfassung der Ergebnisse wieder. Die Grösse der Inhibitor konstante und der Hemmtyp von verschiedenen α -Ketosäuren sind aufgeführt.

Die Abbildungen zeigen die besonders interessierenden Inhibitorkonstanten von α -Ketoisovaleriansäure (Kiva) und α -Keto- β -methylvaleriansäure (Meva). In Abb. 7 u. 8 ist die graphische Bestimmung der Inhibitor konstanten der genannten α -Ketosäuren nach der Methode von Dixon dargestellt. Danach verursachen beide Substanzen wie erwartet eine kompetitive Inhibition.

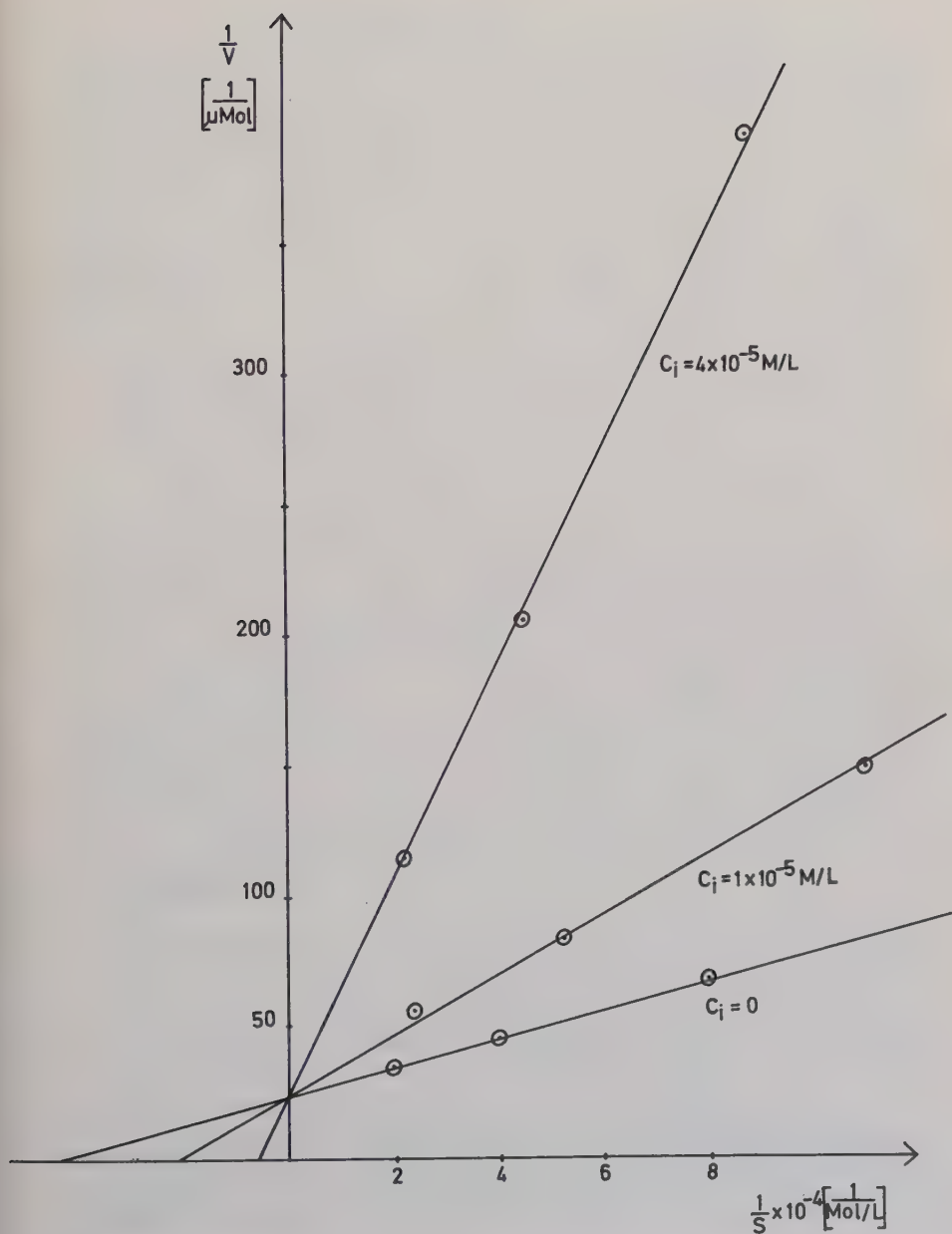


Abb.9 Hemmung der α -Keto-isocapronsäure-Oxydase durch α -Keto- β -methylvaleriansäure (Darstellung nach Lineweaver-Burk).

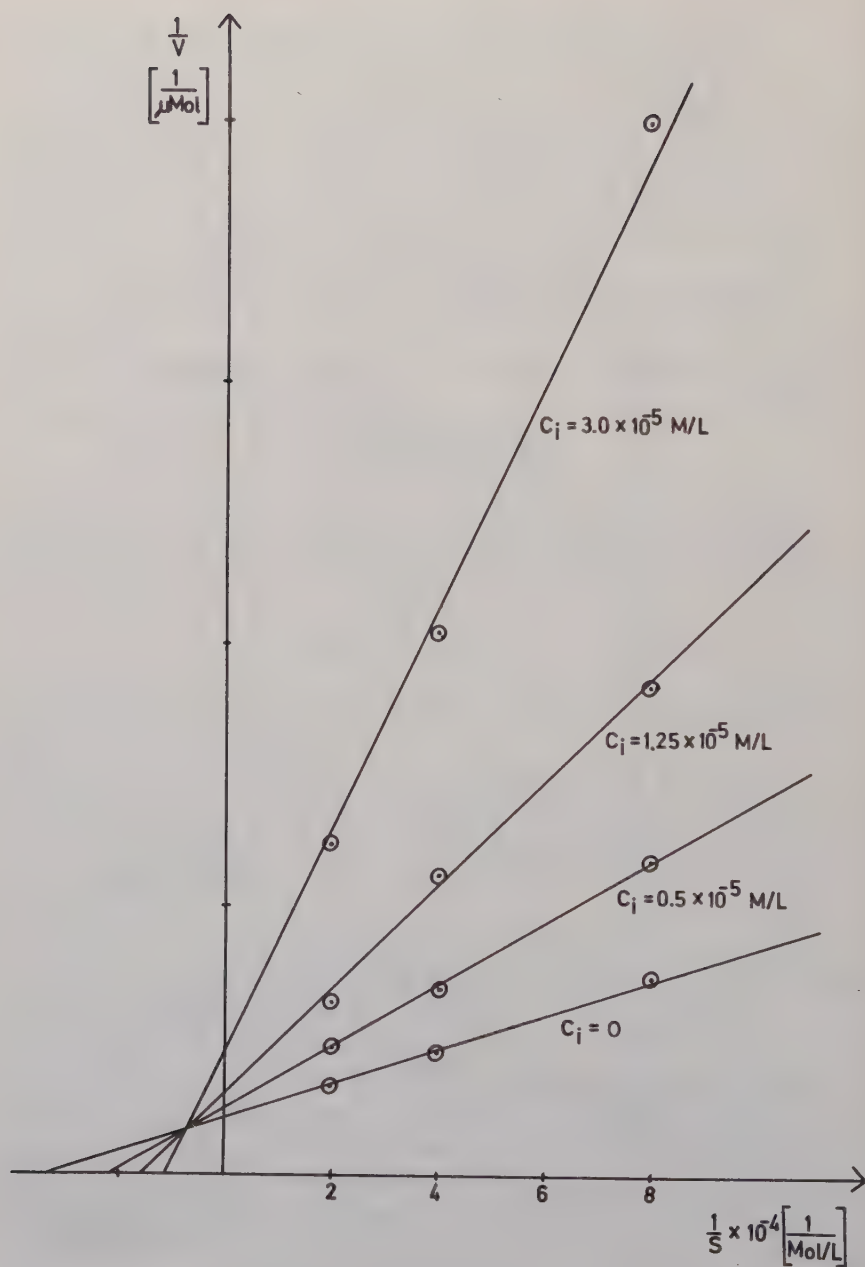


Abb.10 Hemmung der α -Keto-isocapronsäure-Oxydase durch α -Keto-isovaleriansäure (Darstellung nach Lineweaver-Burk).

Tab.V Inhibitorkonzentrationen bei der Bestimmung der Inhibitorkonstanten.

a-Ketosäure	Inhibitorkonzentrationen(M/L)		
a-Keto-isovaleriansäure	$0,5 \times 10^{-5}$	$1,25 \times 10^{-5}$	$3,0 \times 10^{-5}$
a-Keto- β -methylvaleriansäure	$1,0 \times 10^{-5}$	$2,0 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-5}$
a-Keto-n-valeriansäure	$1,0 \times 10^{-5}$	$3,0 \times 10^{-5}$	----
a-Ketobuttersäure	$1,25 \times 10^{-5}$	$2,5 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-5}$
Pyruvat	$0,5 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-3}$
a-Ketoglutarat	$1,0 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-3}$	$4,0 \times 10^{-3}$
Oxalacetat	$0,5 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-3}$

Eine genaue Analyse im Diagramm nach Lineweaver-Burk offenbarte jedoch einen signifikanten Unterschied. Während Meva eine rein kompetitive Inhibition zeigte (Abb.9), handelte es sich bei Kiva eindeutig um einen Mischtyp (Abb.10).

Tab.VI Die Inhibitorkonstanten und die gefundenen Inhibitionstypen.

a-Ketosäure	Inhibitorkonstante	Hemmtyp
a-Keto-isovaleriansäure	$0,71 \times 10^{-5}$ Mol/L	Mischtyp
a-Keto- β -methylvaleriansäure	$0,60 \times 10^{-5}$ Mol/L	kompetitiv
a-Keto-n-valeriansäure ⁺	$1,6 \times 10^{-5}$ Mol/L	kompetitiv
a-Ketobuttersäure	$5,2 \times 10^{-5}$ Mol/L	Mischtyp
Pyruvat	$17,0 \times 10^{-5}$ Mol/L	Mischtyp
a-Ketoglutarat	$247,0 \times 10^{-5}$ Mol/L	Mischtyp
Oxalacetat	$66,0 \times 10^{-5}$ Mol/L	kompetitiv

9. Substratspezifität angereicherter a-Keto-isocaprönsäure - Oxydase.

Der sicherste Beweis für die spezifische Funktion eines Enzyms ist der selective Umsatz eines bestimmten Substrates. Der Grad der Spezifität von Enzymen ist ausserordentlich unterschiedlich. Meist besteht keine absolute Spezifität, sondern es wird ein bestimmtes Substrat in mehr oder weniger ausgeprägtem Masse bevorzugt umgesetzt.

Zur Klärung dieser Frage wurde in angereicherter Kik-Oxydase die Aktivität mit verschiedenen a-Ketosäuren gemessen. Diese Untersuchung gab gleichzeitig Antwort auf die Frage, in welchem

⁺Die K_I von a-Keto-n-valeriansäure wurde nur nach der Methode von Hunter u. Downs bestimmt!

Masse die angereicherte Kik-Oxydase noch durch andere α -Ketosäure-Oxydasen verunreinigt war.

In Abänderung der üblichen Testbedingungen wurde die Umsetzung von Kiva und Meva bei pH 7,4 vorgenommen und je Ansatz 1 μ Mol NAD und 1 μ Mol CoenzymA zugegeben.

Tabelle VII gibt die Umsätze verschiedener α -Ketosäure im Lebereluat und in der Anreicherung wieder. Dabei wurde der Umsatz an Kik stets gleich 100% gesetzt.

Tab.VII Umsetzung verschiedener α -Ketosäuren im Lebereluat und an angereicherter α -Keto-isocaprinsäure-Oxydase bezogen auf α -Keto-isocaprinsäure (100%).

α -Ketosäure	2.Äthanol-fällung	frisches Lebereluat
α -Keto-isocaprinsäure	100	100
α -Keto-isovaleriansäure ⁺	6	120
α -Keto- β -methylvaleriansäure	0,3	25
α -Ketoglutarat ⁺	1,6	170
Pyruvat	1,5	12

Diese Zahlen zeigen eindeutig sowohl die gute Selectivität der Enzympräparation als auch die bemerkenswerte Spezifität dieses Enzyms. Man kann also mit gutem Recht von einer besonderen α -Keto-isocaprinsäure-Oxydase sprechen.

10. pH-Optimum der α -Keto- β -methylvaleriansäure-Oxydase.

Schon durch die vorausgegangenen Untersuchungen wurde deutlich, dass die verzweigten α -Ketosäuren mit grosser Wahrscheinlichkeit von getrennten, spezifischen Enzymen umgesetzt werden.

Die folgenden Befunde bestätigen diese Annahme.

Die Anforderungen an das Testsystem sind bei diesem Enzym ungleich grösser als bei der Kik-Oxydase - Einzelheiten sind im Abschnitt "Methoden" beschrieben. Zunächst seien zwei vergleichende Messungen im Lebereluat erwähnt:

A) Test auf Meva-Oxydase Aktivität im Kik-Oxydase System :	μ Mol Umsatz/1,5h
	6,5
B) Test auf Meva-Oxydase Aktivität mit Cofaktoren (ebenfalls pH 6,3):	13,7

⁺Diese Werte wurden der Dissertation von F. Möhlenbeck entnommen.

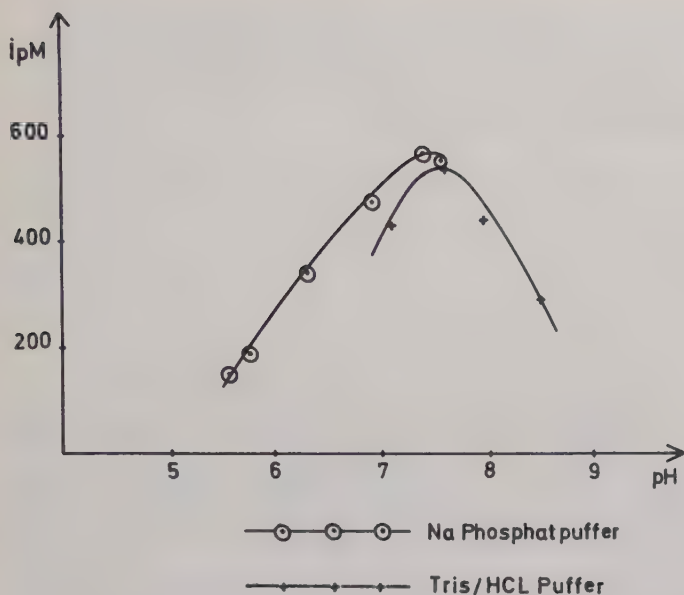


Abb. 11 pH-Optimum von α -Keto- β -methylvaleriansäure-Oxydase (im Leberhomogenat gemessen).

Das pH-Optimum wurde ebenfalls nur im frischen Leberhomogenat des Rindes gemessen. Eine Reinigung des Enzyms wurde nicht angestrebt. Abb. 11 zeigt das Ergebniss dieser Messungen. Das pH-Optimum liegt bei pH 7,5 und ist damit deutlich verschieden von dem der Kik-Oxydase. Die Aktivität ist in Tris/HCl Puffer und Na-Phosphatpuffer gleich gross.

11. Versuch der Herstellung einer Apodecarboxylase des α -Keto-isocaproonsäure-Oxydase Komplexes.

Durch alkalische Hydrolyse gelang es, ein reines Apoenzym der Hefepyruvatdecarboxylase herzustellen (28, 29). Zugegebenes TPP konnte das fast völlig inaktive Enzympräparat wieder ^{nahezu} 100%ig aktivieren.

Auch angereicherte Pyruvat-Oxydase aus Schweineherz hatte ohne TPP-Zusatz nur etwa 40 % der mit TPP gemessenen Aktivität, im Gegensatz zur Kik-Oxydase, die keine Abhängigkeit von zugege-

benem TPP aufweist. Ebenso führte eine mit verschiedenen Variationen ausgeführte alkalische Hydrolyse niemals zu einer signifikanten, reproduzierbaren Aktivierung des Enzyms durch nachher zugegebenes TPP. Ein Beispiel:

Herstellung von Glycocoll-Phosphatpuffer: 90 ml Na_2HPO_4 (3,56g ad 100 ml) + 6,0 ml 10% Glycocoll mit 2N NaOH auf pH 9,7 eingestellt.

3 ml Enzym (9mg/ml) und 2 ml des oben genannten Puffers wurden 30 Minuten inkubiert (im Eisbad). Dann wurde eine 100%ige Ammoniumsulfatlösung (mit NH_4OH auf pH 9,0 eingestellt) bis zu 70% Sättigung zugegeben. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert und in 0,1 M Na-Phosphatpuffer pH 6,7 aufgenommen. Die erhaltene Enzymlösung wurde unter Standardbedingungen mit (1,5 μMol) und ohne TPP getestet. Keine Aktivierung durch TPP wurde festgestellt. Die Gesamtaktivität war durch die Behandlung allerdings stark zurückgegangen.

Dialysen in alkalischem Milieu mit Na-Phosphatpuffer 0,007 M pH 8,7 und Na-Pyrophosphat 0,007 M pH 9,7 erbrachten kein besseres Resultat. Es wurde bis zu 17 Stunden dialysiert, ohne dass eine Abhängigkeit der Aktivierbarkeit des Dialysats mit TPP von der Länge der Dialyse festzustellen war.

12. Einfluss von Cofaktoren und Arsenit auf angereicherte a-Keto-isocaprönsäure-Oxydase.

In der Erwartung, dass während der Enzymaufarbeitung die benötigten Cofaktoren zumindest zum Teil verloren gingen, wurde zu angereicherter Kik-Oxydase im Standardansatz die bekannten Coenzyme der Oxydase zugesetzt. Der Ansatz setzte sich aus folgenden Bestandteilen zusammen (angegeben sind die Endkonzentrationen):

Na-Phosphatpuffer pH 6,3 : $3,6 \times 10^{-2} \text{ M/L}$

a-Keto-isocaprönsäure : $0,75 \times 10^{-3} \text{ M/L}$

Mg^{++} : $1,0 \times 10^{-3} \text{ M/L}$; TPP : $1,0 \times 10^{-3} \text{ M/L}$; NAD : $1,0 \times 10^{-3} \text{ M/L}$;

Liponsäure : $1,0 \times 10^{-4} \text{ M/L}$;

Die Aktivität des Enzyms war in diesem Ansatz nicht signifi-

kant höher als in einem Inkubationsansatz, der nur Substrat und Puffer enthielt.

Arsenit in einer Konzentration von 10^{-3} M/L bewirkte eine Aktivierung von etwa 15%. Die Cofaktoren hatten keinen Einfluss auf diesen Effekt.

10^{-4} M/L FMN oder Riboflavin hemmte die Reaktion um 15%.

Eine Substrathemmung konnte bis zu einer Konzentration von 10^{-2} M/L α -Keto-isocaproensäure nicht festgestellt werden.

II. Teil

Untersuchungen zur Ahornsirup - Krankheit

Im Abschnitt "Methoden" wurde bereits ausführlich über das Verfahren berichtet, das geeignet ist, Individuen zu bestimmen, die heterozygot sind in Bezug auf das mutierte atypische Allel des Gens, das die Synthese des Enzymproteins der α -Keto-isocaproensäure-Oxydase steuert.

In Tabelle VIII sind die Messwerte von 43 untersuchten Personen wiedergegeben. Jeder Messwert ist dabei ein Mittelwert aus drei, bei Heterozygoten aus fünf Einzelmessungen. Normal Homozygote und Heterozygote sind getrennt aufgeführt. Die Verteilung lässt eindeutig eine Häufung um zwei Maxima erkennen. Das arithmetische Mittel beträgt für die "Normalen" 2,09 μ Mol Umsatz pro 3 Stunden pro 16×10^6 Leukozyten; für die "Heterozygoten" lautet die entsprechende Zahl 0,06 μ Mol. Die beiden Gruppen liegen statistisch signifikant getrennt ($p < 0,001$). Eine gewisse Überlappung ist aber vorhanden, deren Ausmass noch durch weitere Untersuchungen genauer bestimmt werden muss.

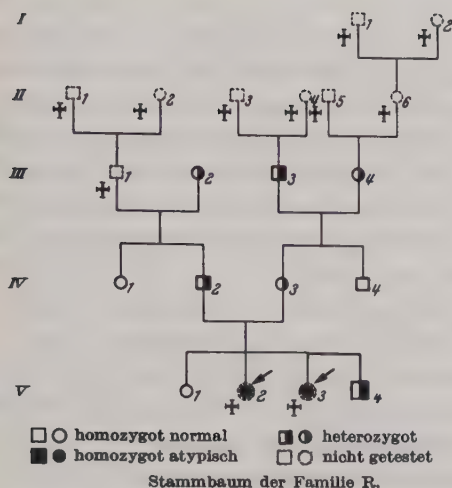
In Abbildung 12 sind die beiden Stammbäume der von uns untersuchten Familien aufgeführt. In der Familie R. waren zwei Kinder kurz nach der Geburt unter cerebralen Symptomen ad exitum gekommen. Die Diagnose Ahornsirup-Krankheit wurde auf Grund von klinischen und klinisch-chemischen Untersuchungen von Schreier (Heidelberg 1962) gestellt. Die beiden gestorbenen Kinder waren also vermutlich homozygot für das entsprechend mutierte

Tab.VIII Aktivität der a-Keto-isocaprönsäure-Oxydase
in menschlichen Leukozyten.

Nr	mpMol umgesetzte a-Keto-iso- caprönsäure	Nr	mpMol umgesetzte a-Keto-iso- caprönsäure
normal Homozygote			
1	1,98	28	1,62
2	2,24	29	1,87
3	2,90	30	2,13
4	2,51	31	1,59
5	2,88	32	1,32
6	1,76	33	1,93
7	2,24	34	1,96
8	1,69	35	2,74
9	1,82	Arithmetisches Mittel = 2,09 $\sigma = 0,51$ $\sigma_{\bar{x}} = 0,09$	
10	2,34		
11	1,96		
12	1,88		
13	2,00	Heterozygote	
14	3,19		
15	1,87		
16	1,88		
17	2,15		
18	3,47		
19	2,19		
20	1,91		
21	2,57		
22	1,32		
23	2,35		
24	1,24		
25	1,50		
26	2,35		
27	1,82		
		Arithmetisches Mittel = 0,71 $\sigma = 0,16$ $\sigma_{\bar{x}} = 0,06$	

Allel. Das Kind V_1 ist nach dieser Untersuchung normal, während die Eltern erwartungsgemäss Aktivitäten der a-Keto-isocaprönsäure-Oxydase zeigen, die Heterozygoten entsprechen. Auch das später geborene Kind V_4 ist heterozygot. Ausserdem sind in dieser Familie III_2 , III_3 und III_4 heterozygot (in der Discussion wird darauf noch eingegangen werden).

Bei dem Kind III_4 der Familie B. wurde die Diagnose in der Universitätsklinik Giessen gestellt. Das Kind wurde etwa 2 Jahre diätetisch behandelt und starb dann an einem intercurrenten Infekt. Das Kind III_2 ist heterozygot, während das Kind III_3 normale Aktivität zeigt. Der Vater dieser Kinder ist wie erwartet heterozygot. Bei der Mutter dagegen wurden Werte nachgewiesen, die einem normal Homozygoten entsprechen (dieser Befund wird unten noch discutiert werden).



*Untersuchungsergebnisse
bei der Familie R. (Mittelwerte aus
mehreren Messungen)*

	IpM*	mμ Mol umgesetzte α-Ketolsocaprinsäure*
III ₂	510	0,75
III ₃	480	0,71
III ₄	520	0,76
IV ₁	1020	1,50
IV ₂	370	0,54
IV ₃	370	0,54
IV ₄	840	1,24
V ₁	2600	3,83
V ₂	612	0,90

* Vergleichswerte (GOEDDE et al. 1964) aus der Normalbevölkerung (n = 35): arithmetisches Mittel = 1420 IpM bzw. 2,09 mμ Mol.

*Untersuchungsergebnisse bei der
Familie B. (Mittelwerte aus
mehreren Messungen)*

	IpM*	mμ Mol umgesetzte α-Ketolsocaprinsäure*
I ₁	590	0,90
II ₂	370	0,54
II ₄	1240	1,82
II ₇	1150	1,69
III ₂	560	0,82
III ₃	1860	2,74

* Vergleichswerte (GOEDDE et al. 1964) aus der Normalbevölkerung (n = 35): arithmetisches Mittel = 1420 IpM bzw. 2,09 mμ Mol.

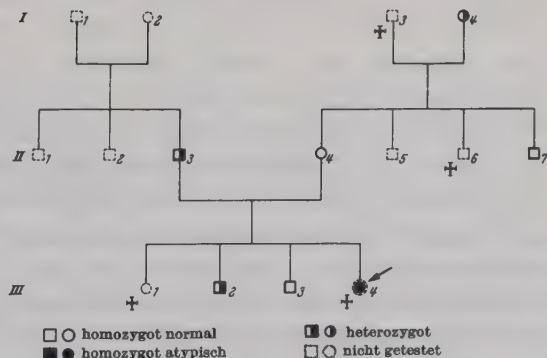


Abb.12 Zwei Stammbäume von Familien, in denen die Ahornsirupkrankheit auftritt.

Discussion.

A) Zu Teil I der Ergebnisse.

- 1) Das Ziel einer möglichst weitgehenden Reinigung der α -Ketoisocaproonsäure-Oxydase aus Rinderleber wurde nur zum Teil erreicht, denn ohne Zweifel repräsentiert nur ein Bruchteil des angereicherten Enzymproteins spezifisches Enzym der Kik-Oxydase. Ungeklärt ist vor allem das völlige Versagen von Geladsorptions- und Ionenaustauschverfahren, obwohl z.B. Massey mit einer Ca-Phosphatgel-Säule eine hochgradige Anreicherung der α -Ketoglutarat-Oxydase beschrieben hat(40).

Ausschlaggebend für den Misserfolg waren hauptsächlich die sehr geringen Ausbeuten bei der Elution. Der Verdacht eines Coenzym-Mangels liess sich dabei niemals bestätigen. Auch für eine besondere Labilität des Enzyms gab es keinerlei Hinweise. Vielmehr demonstriert das "Zeit-Aktivitäts Diagramm" eine relativ lange Aktivität des Enzyms und auch die gute Verträglichkeit des Äthanol bestätigt eine "normale Strapazierfähigkeit". Ähnliche Schwierigkeiten hatte allerdings auch Schweet bei der Isolierung von Pyruvat-Oxydase aus Taubenbrustmuskel(58).

Auffallend bei der Anreicherung war die hohe Ausbeute der 1. Äthanol-fällung, die sehr schwankte von Aufarbeitung zu Aufarbeitung, aber fast immer höher lag als nach der Säurefällung. Man muss annehmen, dass nach der Säurefällung nicht die wahre Aktivität in der Lösung gemessen wurde. Die sehr geringe Ausbeute nach dem letztgenannten Schritt verstärkt diesen Verdacht. Die genauere Ursache dieses Effektes ist noch nicht bekannt.

- 2) Die Michaelis-Konstante der Kik-Oxydase liegt mit $2,1 \times 10^{-5} \text{ M/L}$ im Bereich anderer Oxydasen. Zum Beispiel ist für die α -Ketoglutarat-Oxydase aus Schweineherz eine K_M im NAD-Test von $1,3 \times 10^{-5} \text{ M/L}$ angegeben(40).
- 3) Das Gleichgewicht der Reaktion im Standarttest lag unter den angegebenen Bedingungen nicht, wie erwartet, ganz auf der Seite des Endproduktes, obwohl es sich dabei um die energiearme Isovaleriansäure handelte (auf den chromatographischen Nachweis dieser Substanz wurde in der vorliegenden Arbeit nicht eingegangen).

Die Reaktion ist im Einzelnen noch wenig verstanden. Es ist zum Beispiel unklar, wohin der Wasserstoff oder allgemeiner gesprochen die "Reduktionsäquivalente" übertragen werden, die bei der oxydativen Decarboxylierung frei werden. Weder die Zugabe von O_2 noch von DCP oder Ferricyanid hatten einen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Ein kleiner Bruchteil des Wasserstoffs könnte auf die α -Ketosäure mittels der Lactatdehydrogenase übertragen werden. Es entstünde dann die entsprechende β -Hydroxysäure. Die Reaktionsfolge ist in Abbildung 13 dargestellt.

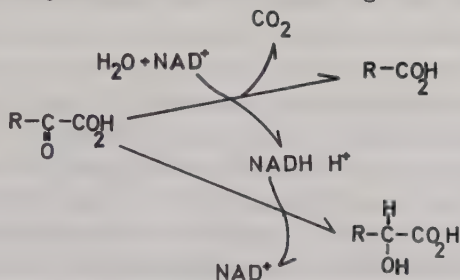


Abb.13 Möglicher Weg des Wasserstoffs im Standardansatz.

Es ist einleuchtend, dass unter diesen Verhältnissen ein optischer Test mit NAD nicht funktionieren kann, da das gebildete NADH sofort wieder verbraucht wird.

- 4) Über die beteiligten Coenzyme lassen sich nach den bisherigen Ergebnissen noch keine sicheren Aussagen machen, wenn auch eine Analogie zu anderen Oxydasen sehr wahrscheinlich ist. Ein Apoenzym durch Abspaltung des TPP, wie das bei der Hefedecarboxylase und der Pyruvat-Oxydase aus dem gleichen Material durchgeführt wurde, konnte nicht hergestellt werden. Dieses Experiment ist aber auch bei der α -Ketoglutarat-Oxydase noch nicht mit positivem Ergebnis gelungen. Die Unabhängigkeit der Reaktion von zugegebenen CoA und NAD ist an sich zu erwarten, da in dem benutzten Test nur die Decarboxylase-Reaktion gemessen wird und die Reaktion dann direkt zur Isovaleriansäure verläuft. Umso erstaunlicher ist die Tatsache, dass Meva-Oxydase schon im rohen Leberextrakt eine ausgesprochene CoA- und NAD-Abhängigkeit aufweist. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass es sich höchst wahrscheinlich um zwei verschiedene Enzyme handelt.

- 5) Der Hemmeffekt des FMN und des reinen Riboflavin ist zunächst nicht zu erklären, und in der Literatur sind auch keine Angaben darüber zu finden. Auch L-Aminosäure-Oxydase aus Schlangengift, die ja FMN enthält, führt diesen Effekt herbei. Möglicherweise kommt es zu einer Störung bei der Oxydation zur Isovaleriansäure. Eine Hemmung der Lipoamid-oxidoreduktase kann sicher nicht die Ursache sein, da dieser Bestandteil des Oxydase-Komplexes unter den beschriebenen Testbedingungen nicht in Funktion tritt. Deshalb kann – aus dem selben Grund – auch keine Arsenithemmung erwartet werden. Ebenso unerklärlich wie die genannte Flavinhemmung ist auch die stets reproduzierbare Arsenit-Aktivierung.
- 6) Die Bestimmung der Inhibitorkonstanten ergab einige interessante Befunde. So steigt mit der Kettenlänge die Affinität der unverzweigten α -Ketosäuren von Pyruvat über α -Ketobuttersäure nach α -Keto-n-valeriansäure an. Ausserdem scheint die Kettenlänge der wesentliche Faktor zu sein für die Wirkungsweise des Inhibitors am Enzym. Denn Pyruvat und α -Ketobuttersäure haben im Gegensatz zu α -Keto-n-valeriansäure eine nicht kompetitive Hemmkomponente. Dies bedeutet, dass diese Substanzen ausser am "Substratlocus" noch an einer anderen Stelle des Enzyms angreifen. – Im Rahmen dieser Dissertation konnten keine Ketosäuren mit "zu langer" Kette untersucht werden. Auch Kiva verändert sowohl die K_M als auch V_{max} der Kik-Oxydase. Es handelt sich also ebenfalls um einen Mischtyp. Bei der ausserordentlichen strukturellen Ähnlichkeit zu Kik muss dieser Befund überraschen. Er stimmt aber überein mit der oben erwähnten grossen Bedeutung der Kettenlänge für den Hemmtyp. Meva, mit der gleichen Kettenlänge wie Kik, aber anderem Verzweigungstypus, zeigt rein kompetitive Inhibition. Der Befund stimmt somit ebenfalls mit den bisher gemachten Annahmen überein. Die Verhältnisse bei den Dicarbonsäuren sind nicht ganz klar. So hat α -Ketoglutarat zwar die gleiche Kettenlänge wie Kik und Meva, besitzt aber dennoch eine geringe nicht kompetitive Hemmkomponente. Oxalacetat dagegen hemmt rein kompetitiv. Dieser Befund erklärt vielleicht zum Teil die Tatsache, dass im Gegensatz zu den abgeleiteten Gesetzmässigkeiten Oxalacetat

eine grössere Affinität zur α -Keto-isocaproinsäure-Oxydase aufweist als α -Ketoglutarat (mit der richtigen Kettenlänge von 5 C Atomen). Beide Verbindungen sind relativ schwache Inhibitoren. Dies weist darauf hin, dass sich die zweite Carboxylgruppe nur ungenügend in die aktiven Bezirke der Enzymstruktur einpasst.

- 7) Während Substanzen, die nicht kompetitiv hemmen, sicher nicht von dem entsprechenden Enzym umgesetzt werden, da sie nicht am primären Ort der Enzymreaktion angreifen, lässt sich eine solche definitive Aussage bei der kompetitiven Hemmung nicht machen. In diesem Fall muss die betreffende Substanz mit dem Enzym inkubiert und auf den Umsatz getestet werden. Besonders interessierte hier, ob Meva in angereicherter Kik-Oxydase umgesetzt würde, denn von Kiva war dies auf Grund des Hemmtyps weniger zu erwarten. Diese Frage muss eindeutig verneint werden. Der Meva-Umsatz in angereicherter Kik-Oxydase war verschwindend gering und muss auf Verunreinigung mit spezifischer Meva-Oxydase zurückgeführt werden. - Es ist auffallend, dass die Meva-Oxydase Aktivität im rohen Leberextrakt nur etwa 25 % der Kik-Oxydase Aktivität betrug. -

Fügt man diesen Befunden noch den unterschiedlichen Coenzymbedarf - Meva-Oxydase braucht schon im Rohextrakt zur optimalen Funktion CoA und NAD - und das sehr verschiedene pH-Optimum hinzu, so kann als sicher angenommen werden, dass für Kik und Meva im Stoffwechsel zwei verschiedene Enzyme vorhanden sind mit relativ grossen Unterschieden.

- 8) Auch die strukturellen und damit chemisch-physicalischen Eigenschaften der Oxydasen der verzweigtkettigen α -Ketosäuren müssen ziemlich signifikante Unterschiede aufweisen, sonst wäre eine so gute Trennung der Kik-Oxydase von den genannten verwandten Enzymen durch verhältnismässig einfache Methoden wie Äthanol-fällungen nicht möglich gewesen. Die Oxydasen sind also Enzyme hoher Spezifität und zwar nicht nur in Bezug auf ihre Funktion, sondern auch hinsichtlich ihrer Struktur. Dies hängt sicherlich zusammen mit der komplizierten Reaktionsfolge, die in dem Enzymkomplex abläuft. Da z.B. α -Keto- β -methylvaleriansäure trotz höherer Affinität zum Ort der Substratbindung als

das physiologische Substrat nicht umgesetzt wird, wäre es von einigem Interesse zu erfahren, welche genaue strukturelle Bedingung erfüllt sein muss, damit eine α -Ketosäure von dem hier untersuchten Enzym decarboxyliert werden kann.

Eine Kettenlänge von 5 C Atomen ist sicher eine Bedingung; ob eine Verzweigung vorhanden sein muss, konnte nicht festgestellt werden, da von α -Keto-n-valeriansäure kein ^{14}C -markiertes Präparat zur Verfügung stand. Zumindest erhöht aber die Verzweigung die Affinität sowohl bei richtiger Kettenlänge (α -Keto-n-valeriansäure: $K_I = 1,6 \times 10^{-5}$; α -Keto- β -methylvaleriansäure: $K_I = 0,6 \times 10^{-5}$) als auch bei zu kurzer Kette (K_I von α -Ketobuttersäure: $5,2 \times 10^{-5}$; K_I von α -Keto-isovaleriansäure: $0,7 \times 10^{-5}$). - Es ist bemerkenswert, dass sowohl die K_I von Kiva als auch die von Meva niedriger liegen als die Michaelis-Konstante des physiologischen Substrats (Kik).-

Tiefere Einblicke in den Reaktionsmechanismus und den Coenzymbedarf und deren Affinität zum Enzym wird man erst erlangen, wenn es gelingt, einen Test zu entwickeln, der in spätere Stufen der Reaktion angreift, am besten also ein Test auf der Grundlage von NAD. Dies wird aber erst möglich sein, wenn ein sehr reines Enzympräparat zur Verfügung steht, in dem auch die letzten Spuren von Lactatdehydrogenase fehlen.

B) Zu Teil II der Ergebnisse:

Im Folgenden sei noch auf die Ergebnisse der Familienuntersuchungen zur Ahornsirupkrankheit eingegangen.

Die statistische Auswertung von 35 Normalpersonen und 8 Heterozygoten zeigt, dass der beschriebene Test geeignet ist, Individuen zu bestimmen, die heterozygot sind in Bezug auf das mutierte Allel des Gens, das normalerweise die Synthese des Enzymproteins der α -Keto-isocaproinsäure-Oxydase steuert.

In Familie R. ist bemerkenswert, dass beide Elternteile (III_3 und III_4) der Probandenmutter (IV_3) entsprechend der gemessenen Kik-Oxydase Aktivität heterozygot sein sollen. Dies ist aber ein recht unwahrscheinliches Ereignis bei der angenommenen Seltenheit des mutierten Gens. Würde man allerdings eine Häufigkeit analog des Galactosämie-Gens annehmen (0,00373; Holzel 1961)

dann wäre grob geschätzt mit einer Heterozygotenhäufigkeit von 1 : 270 zu rechnen und das Messergebnis würde sehr an Wahrscheinlichkeit gewinnen. Eine Consanguinität, die den Befund am leichtesten erklären würde, konnte nicht nachgewiesen werden.

In der Familie B. zeigt die Mutter (II₄) des Probanden (III₄) eine normale Enzymaktivität, obwohl die Mutter nach der Erfahrung bisheriger Untersuchungen heterozygot sein müsste. Da die Grossmutter (I₄) eine verringerte Enzymaktivität aufweist ebenso wie der Bruder (III₂) des Probanden, was auf Heterozygotie schliessen lässt, ist die Hypothese einer Neumutation zu verwerfen. Eine Fehlanalyse wurde durch wiederholte Messungen ausgeschlossen. Der serologische Status spricht nicht gegen ein Mutter-Kind Verhältnis. Eine geeignete Erklärung wäre ein weiterer Überschneidungsbereich der Messwerte von homozygot Normalen und Heterozygoten. Über die Ursache eines solchen "Overlap" ist damit natürlich noch nichts ausgesagt. Es wäre auch möglich, dass nicht der einfache - bis jetzt angenommene - sogenannte rezessive Erbgang besteht, oder dass es verschiedene Formen der Ahornsirupkrankheit gibt (neueste Untersuchungen scheinen darauf hinzudeuten).

Da sich bei der Ahornsirupkrankheit alle drei verzweigten Aminosäuren und deren entsprechende α -Ketosäuren anstauen, nach den oben ausgeführten biochemischen Untersuchungen aber für jede der drei Ketosäuren ein besonderes Enzym vorhanden ist, lassen sich die biochemischen Phänomene dieser Erkrankung in Richtung zweier Möglichkeiten diskutieren.

Entweder fällt eines der drei Strukturgene aus z.B. dasjenige, welches zur Synthese der α -Keto-isocaprönsäure-Oxydase bestimmt ist. Dann staut sich die entsprechende Ketosäure an und wirkt als Inhibitor für die anderen beiden Enzyme, sodass phänotypisch das Bild eines Ausfalls aller drei Enzyme erscheint. Oder aber es käme im Sinne der Hypothese von Jacob und Monod zum Defekt eines allen drei Strukturgenen übergeordneten Operatorgens, was zu den gleichen Ausfällen führen würde. Ob diese Annahmen oder vielleicht ganz andere Verhältnisse den Tatsachen entsprechen, wird sich nur so feststellen lassen,

dass man heterozygote und homozygot atypische Individuen hinsichtlich der Aktivität aller drei Enzyme für den Abbau des Valin, Leucin und Isoleucin untersucht (derartige Untersuchungen sind bereits im Gange).

Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit wird über ein Anreicherungsverfahren der α -Keto-isocaproonsäure-Oxydase aus Rinderleber berichtet. Es werden pH-Optimum, Michaelis-Konstante und Coenzym-abhängigkeit des angereicherten Enzyms angegeben.

Die Inhibition dieses Enzyms durch verschiedene α -Ketosäuren wird untersucht. Inhibitorkonstanten und Hemmtypen für einige α -Ketosäuren sind aufgeführt.

Der Umsatz anderer α -Ketosäuren durch angereicherte α -Keto-isocaproonsäure-Oxydase wird angegeben; auf Grund dieser Ergebnisse wird die Spezifität diskutiert. Einige Eigenschaften der α -Keto- β -methylvaleriansäure-Oxydase werden beschrieben.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wird ein Heterozygotentest für die Ahornsirupkrankheit beschrieben. Messergebnisse für je eine Gruppe von "homozygot normalen" und "heterozygoten" Individuen werden angegeben. Zwei Familienuntersuchungen werden dargestellt. Die nicht den Erwartungen entsprechenden Ergebnisse werden diskutiert und Interpretationsmöglichkeiten vorgeschlagen.

Literatur

- 1) A.Alvarez,E.Vanderwinkel and J.M.Wiame:Biochim.Biophys. Acta 28 , 333 (1958).
- 2) B.K.Bachhawat,J.F.Woessner,Jr. and M.J.Coon:Fed.Proc. 15 , 214 (1956).
- 3) B.K.Bachhawat,W.G.Robinson and M.J.Coon:J.Am.Chem.Soc. 76 , 3098 (1954).
- 4) D.R.Buhler:Analyt.Biochem. 4 , 413 (1962).
- 5) M.J.Coon:Fed.Proc. 14 , 762 (1955).
- 6) J.Dancis et al. :Pediatrics 25 , 72-79 (1960).
- 7) J.Dancis,J.Hutzler and M.Levitz:Biochim.Biophys.Acta 43 , 342 (1960).
- 8) C.E.Dent,R.G.Westall:Arch.Dis.Child. 36 , 259-268 (1961).
- 9) M.Dixon and E.C.Webb:Enzyms ;London:Longmans,Green and Co. 1958 ; p.19
- 10) M.Dixon and E.C.Webb:Enzyms ;London:Longmans,Green and Co. 1958 , p. 171 .
- 11) M.Dixon:Biochem.J. 55 , 170 (1953).
- 12) H.Fernandes-Moran,L.J.Reed,M.Koike and R.Willens: Science(Washington) 145 , 930 (1964).
- 13) H.Frank und P.H.Koecher:Deut.Arch.Klin.Med. 197 ,181(1950).
- 14) T.E.Friedmann und G.E.Haugen:J.Biol.Chem. 147 ,415(1943).
- 15) H.W.Goedde:Int.Z.Vitaminforschung 33 ,18(1963).
- 16) H.W.Goedde,E.Richter u. C.Stahlmann:Klin.Wochenschr. 41 , 953-954(1963).
- 17) H.W.Goedde,E.Richter,M.Hüfner u.B.Sixel:Klin.Wochenschr. 42 ,818-819(1964).
- 18) D.E.Green:Biol.Rev. 29 , 330(1954).
- 19) I.C.Gunsalus in:The Mechanism of Enzyme Action,hrg. von McElroy,W.D. and B.Glass,Baltimore:The Johns Hopkins Press (1954) p. 545 .
- 20) I.C.Gunsalus:Fed.Proc. 13 , 715(1954).
- 21) I.C.Gunsalus,L.S.Barton and W.Gruber:J.Amer.Chem.Soc. 78 , 1763(1956).
- 22) I.C.Gunsalus:J.Vitaminol.(Kyoto) 4 ,52(1958).
- 23) U.C.R.Henri:Acad.Sci.(Paris) 135 ,916 (1902).
- 24) A.Holzel in F.Linneweh:Erbliche Stoffwechselkrankheiten S.213 ;München-Berlin:Urban & Schwarzenberg (1962).
- 25) H.Holzer und H.W.Goedde:Biochem.Z. 329 , 175 (1957).
- 26) H.Holzer and K.Beaucamp:Biochim.Biophys.Acta 46 ,225(1961).

- 27) H.Holzer:Angew.Chem. 73 , 721 (1961).
- 28) H.Holzer u. H.W.Goedde:Biochem.Z. 329 , 192 (1957).
- 29) E.H.Holzer,D.Söling,H.W.Goedde u. H.Holzer in:Methoden der enzymatischen Analyse,hrsg. von H.U.Bergmeyer, S. 605 Weinheim/Bergstrasse;Chemie GMBH (1962).
- 30) V.Jagannathan and R.S.Schweet:J.biol.Chem. 196 , 551 (1952).
- 31) H.M.Kalkar:J.biol.Chem. 167 , 461 (1947).
- 32) S.Kaufmann, C.Gilvarg, O.Cori,and S.Ochoa:J.biol.Chem. 203 ,869 (1953).
- 33) M.L.Das M.Koike and L.J.Reed:Proc.nat.Acad.sci.(USA) 47 , 753 (1961).
- 34) M.Koike and L.J.Reed:J.biol.Chem. 236 Nr.6 ,333 (1961).
- 35) M.Koike and L.J.Reed:J.biol.Chem. 235 , 1931 (1960).
- 36) S.Korkes,A.Del Campillo and S.Ochoa:J.biol.Chem. 495195 , 541 (1952).
- 37) S.Korkes:J.biol.Chem. 193 , 721 (1951).
- 38) F.Linneweh u. M.Ehrlich:Klin.Wschr. 6 , 255 (1963).
- 39) F.Lynen:Bull.Soc.Chem.Biol. 25 , 1061 (1953).
- 40) V.Massey:Biochim.biophys.Acta 38 , 447 (1960).
- 41) V.Massey:J.biol.Chem. 235 Nr.10 , PC 48 (1960).
- 42) V.Massey and C.Veeger:Biochim.biophys.Acta 48 , 33 (1961).
- 43) V.Massey and N.M.Atherton:J.biol.Chem. 237 , 2965 (1962).
- 44) A.Meister:Biochemistry of the Aminoacids,New York:Academic Press 1957.
- 45) A.Meister:J.biol.Chem. 190 , 269 (1951).
- 46) J.Menkes:Pediatrics 23 , 348 (1959).
- 47) W.Müller u. K.Schreier:Die Ahornsirup-Krankheit,Dtsch. med.Wschr. 48 , 2479 (1962).
- 48) H.Nawa,W.T.Brady,M.Koike,and L.J.Reed:J.Amer.chem.Soc. 82 , 896 (1960).
- 49) S.Ochoa in:Advances in Enzymology,hrsg. von F!F.Nord, Band 15,S.183 .New York:Interscience Publishers (1954).
- 50) D.R.Sanadi and R.L.Searls:Biochem.biophys.Acta 24 , 220 (1957).
- 51) D.R.Sanadi and Litt~~le~~field:J.biol.Chem. 193 , 683 (1951).
- 52) D.R.Sanadi,M.Langley,and R.L.Searls:J.biol.Chem. 234 , 178 (1959).
- 53) D.R.Sanadi,J.W.Littlefield,and R.M.Bock:J.biol.Chem. 197 , 851 (1952).
- 54) D.R.Sanadi and J.W.Littlefield:Science(Washington) 116 , 327 (1952).

- 55) N.Savage:Biochem.J. 67 , 146 (1957).
- 56) R.S.Schweet and K.Cheslock:J.biol.Chem. 199 , 749(1952).
- 57) R.S.Schweet,M.Fuld,and al. :Phosphorus Metabolism,Vol.I p.259 ;the Johns Hopkins Press,Baltimore (1951).
- 58) R.S.Schweet,B.Katchman,R.M.Bock,and V.Jagannathan: J.biol.Chem. 196 , 563 (1952).
- 59) R.L.Searls and D.R.Sanadi:J.biol.Chem. 236 , 580 (1961).
- 60) R.L.Searls and D.R.Sanadi:J.biol.Chem. 235 Wr.8 , PC 32 (1960).
- 61) R.L.Searls,J.M.Peters,and D.R.Sanadi:J.biol.Chem. 236 , 2317 (1961).
- 62) M.Strassman,A.J.Thomas,and S.Weinhouse:J.Amer.Chem.Soc. 77 , 1261 (1955).
- 63) M.Strassman:J.Amer.Chem.Soc. 80 , 1771 (1958).
- 64) F.B.Straub:Biochem.J. 33 , 787 (1939).
- 65) O.Warburg u. W.Christian:Biochem.Z. 310 , 384 (1942).
- 66) T.E.Weichselbaum;Amer.Clin.Path. 10 , 40 (1946).
- 67) R.G.Westall,J.Dancis,M.Levitz,and S.Miller:Fed.Proc. 17 , 334 (1958).

Ich danke Herrn Priv.Doz. Dr.H.W.GOEDDE für die
freundliche Überlassung des interessanten Themas.

Lebenslauf.

Ich wurde am 25.9.1940 in Dessau geboren als drittes Kind des Dipl. Volkswirts Dr. Adam Hufner und seiner Ehefrau Ovene geb. Jessen. Im Sommer 1945 siedelten wir nach Darmstadt über.

Vom Herbst 1946 bis Frühjahr 1951 besuchte ich die Volksschule in Darmstadt-Arheilgen.

Von 1951 bis 1960 war ich Schüler des altsprachlichen Ludwig-Georg-Gymnasiums in Darmstadt. Dort legte ich am 20.2.1960 die Reifeprüfung ab.

Vom Frühjahr 1960 bis Herbst 1962 studierte ich Medizin an der Philipps-Universität in Marburg.

Danach begann ich mein klinisches Studium an der Albert-Ludwig Universität in Freiburg i.Br. .Am 20.12.1965 legte ich dort das medizinische Staatsexamen ab.

Für das akademische Jahr 1966/67 wurde mir vom Deutschen Akademischen Austauschdienst(DAAD) ein Stipendium zum Studium auf dem Gebiet der Biochemie an der Brandeis University (USA) verliehen.

